Université de Paris — Faculté de Pharmacie

Année 1966 - 1967 Série E - N° 161

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'État)

par

Madame BUI - KHAC - DIEP

Première Thèse :

Recherches sur le dosage des Cellulases dans les préparations pharmaceutiques

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 18 Avril 1967

JURY : MM. les Professeurs COURTOIS, Président
LARUELLE
PERCHERON } Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545806_0016

Université de Paris — Faculté de Pharmacie

Année 1966 - 1967 Série E - N° 161

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'État)

par

Madame BUI - KHAC - DIEP

Première Thèse :

Recherches sur le dosage des Cellulases dans les préparations pharmaceutiques

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 18 Avril 1967

JURY : MM. les Professeurs COURTOIS, Président

LARUELLE
PERCHERON } Examinateurs

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

par

Madame BUI-KHAC-DIEP

Première Thèse :

Recherches sur le dosage des Cellulases dans les préparations pharmaceutiques

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 16 Avril 1969

JURY : MM. les Professeurs CHARPENTIER, Président

LANDAULT

PERCHERON

Examinateurs

PERSONNEL DE LA FACULTE
DE PHARMACIE DE PARIS

-o-o-o-

ADMINISTRATION

MALANGEAU P..... Doyen
GUILLOT M..... Assesseur, O +

RODINEAU L..... Secrétaire Général, +
FERRARI (Mme S.)..... Attachée Principale
JEANDEL L..... Attaché
ESPINASSE (Mme M.L.)..... Attachée
BRENN A..... Attaché, +
JACOB A..... Attaché, +
MUR (Mme A.M.)..... Attachée
FRIZOL (Mlle E.)..... Attachée
TRICAN J..... Attaché

PROFESSEURS HONORAIRES

LAUNOY L..... O +
FLEURY P..... O +
PICON M..... O +
BEDEL C..... +

PROFESSEURS

JANOT M.-M., O +..... Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G., O +..... Pharmacodynamie (T)
PARIS R., + ... Matière Médicale (T)
GUILLOT M., O +..... Physique (T)
GAUTIER J.-A., O +..... Chimie Organique (T)
LAMBIN (Mlle S.), +..... Microbiologie (T)
RAOUL Y., +..... Physiologie (T)
COURTOIS J., +..... Chimie Biologique (T)
DOMANGE L., O +..... Chimie Générale et Minérale (T)
TRUHAUT R., O +..... Toxicologie (T)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MORETTE A., +	Hydrologie (T)
CAVIER R., +	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A., +	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R., +	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A.	Virologie et Sérologie (T)
PIETTE M., +	Biologie Sanguine (T)
MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
GIRARD M., +	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
DEYSSON G.	Botanique (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie Organique (T)
LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
LARUELLE P.	Physique
ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie
MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle
DELAVEAU P.	Matière Médicale et Séméiologie
COHEN Y.	Pharmacodynamie
RENAULT H.	Physique
BOURDON R.	Chimie Analytique
REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
LE MOAN R.	Toxicologie
POISSON J.	Pharmacie Galénique
MICHEL R.	Endocrinologie (T)

M A I T R E S D E C O N F E R E N C E S

PAOLETTI C.	Toxicologie
DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique
PERCHERON F.	Chimie Biologique
SAVEL J.	Biologie Animale
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie Organique
GUIGNARD J.L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.-C.	Physiologie
BINET P.	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie Organique
PLAT (Mme M.)	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
GUERNET M.	Chimie Analytique et Bromatologie
DIDRY J.	Physique
LEDOUBLE G.	Chimie Minérale et Minéralogie
KHODADAD P.	Chimie Minérale et Minéralogie
PERLES R. (F.F.)	Chimie Biologique
YONGER J. (F.F.)	Chimie Analytique

C H E F S D E T R A V A U X P R A T I Q U E S

AGNERAY (Mme) (F.F.)..... Chimie
AGNERAY J. (F.F.)..... Chimie Biologique
ASTIN C. (F.F.)..... Physique
BLANC (Mme J.)..... Chimie Organique
BARNIER (Mme S.)..... Mathématiques
BESANCON (F.F.)..... Mathématiques
BOURNIQUE (Mlle C.) (F.F.)..... Physiologie Végétale
CARLIER A. (F.F.)..... C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle
CENAC (Mme J.) F.F.)..... C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique
CHARPENTIER (Mme M.)..... Chimie Préparation
CHOIX (Mlle M.)..... Pharmacie Galénique
DAGRON C..... Chimie Organique
COMPAGNON P. (F.F.)..... Chimie Organique
DAVY J. (F.F.)..... C.E.S. Biochimie
DECAUDIN (Mlle M.-T.)..... Parasitologie
DREUX C..... C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUBET (Mlle S.)..... Chimie Préparation
ETIENNE G..... Pharmacie Galénique
ETIENNE J. (F.F.)..... Physique
FLEURY (Mlle S.)..... Chimie
GOURSAT (Mlle M.J.) (F.F.)..... Botanique
JAIOI M..... Chimie Analytique
MARTOPE J. + ... Chimie Organique
MAZEBROUCQ G..... Physique
HENRY J..... Chimie
HUAN YONG (F.F.)..... Chimie Générale et Minérale
HUBERT (Mme J.)..... C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique
HURON (Mme M.J.)..... Mathématiques
JUND (Mlle M.)..... C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
LAROCHE J..... Physique
LEBOEUF M. (F.F.)..... C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
LAGER (Mme M.)..... Zoologie
LALEGRIE P. (F.F.)..... C.E.S. Biochimie
LELUC R..... Microbiologie
LEMONNIER A..... Chimie Analytique
LEVILLAIN P..... Chimie Analytique
LIKFORMAN J. (F.F.)..... Physique
LONGEVIALE (Mlle M.)..... Botanique
MACCARIO J. (F.F.)..... Mathématiques
MANDEREAU J. (F.F.)..... C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MANUNIER J..... Chimie Analytique
MARTIN-FRERE H..... Chimie Organique
MICHELET A. (F.F.)..... Chimie Minérale

MORIN (Mlle H.)..... C.E.S. Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments
MOSKOWITZ H..... Chimie Organique
NOTTEGHEM (Mme M.) (F.F.)..... Zoologie
NGUYEN PHU LIOM (F.F.)..... C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
PARIS M. (F.F.)..... C.E.S. Analyse Appliquée au Contrôle des Médicaments (Biologie)
PESTIS J..... Biologie Animale
PINGUET (Mlle A.) (F.F.)..... C.E.S. Analyse Appliquée au Contrôle des Médicaments (Section Physico-Chimie)
POULLAIN P..... C.E.S. Hématologie
PRAT (Mme M.T.)..... Mathématiques
RAYNAUD G..... Anatomie et Histologie
REVOL J..... Physique
ROLLIN (Mlle A.) +, ... Botanique
ROUSSELET (Mlle R.) (F.F.)..... Essais des Drogues Végétales
ROUART (Mme M.)..... C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
SEILLER (Mme M.) (F.F.)..... Pharmacie Galénique Industrielle
THUONG CONG TRIEU (F.F.)..... Chimie Analytique
TROUPEL (Mme S.) (F.F.)..... Chimie

B I B L I O T H E Q U E

RUYSSEN (Mlle Y.) +,..... Conservateur en Chef
LAVAUD (Mlle S.)..... Conservateur
DESGRIPPES (Mme A.)..... Conservateur
BOUVRESSE (Mlle A.M.)..... Bibliothécaire

-o-o-o-

+ Légion d'Honneur

O Officier

C Commandeur

À la mémoire de mon père.

À ma mère.

À mon mari.

À mes enfants.

À tous les miens.

A mon Maître,

Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui m'a fait le grand honneur de m'accepter au laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris parmi ses élèves,

qui m'a confié le sujet de cette thèse et m'a guidée tout au long de ce travail avec sollicitude et bienveillance,

qui a bien voulu présider mon jury

en témoignage de ma profonde gratitude et de mon respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien honoraire des Hôpitaux psychiatriques de la Seine,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Officier de la Légion d'Honneur

qui a toujours porté un bienveillant intérêt à mon travail,

avec l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. LARUELLE

Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui a bien voulu accepter de juger ce travail

en témoignage de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur F. PERCHERON

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui m'a aidée de ses conseils si précieux,

et qui m'a fait l'honneur de faire partie

de mon jury

avec mes sentiments de profonde reconnaissance.

RECHERCHES

SUR

LE DOSAGE DES CELLULASES

DANS LES PREPARATIONS

PHARMACEUTIQUES

—o—o—o—

I N T R O D U C T I O N

-o-o-o-

La dégradation de la cellulose par les microorganismes a été signalée la première fois par HOPPE-SEYLER (51) en 1883 et le rôle qu'y joue la cellulase a été prouvé clairement par SEILLIERE en 1906 (114). Ce dernier a démontré que le suc d'hépatopancréas d'escargot possède, in vitro, une action hydrolysante sur la cellulose et les dérivés solubles de la cellulose.

Depuis, la décomposition biologique de la cellulose a fait l'objet de nombreux travaux. La présence de cellulase chez les végétaux suggère à certains auteurs son intervention dans le processus de germination (PREECE et GARG 99; ENEBO et coll. 28), dans la croissance des jeunes plants (DER FONG FAN et MACLACHLAN 25).

Sur le plan pratique, les préparations commerciales de Trichoderma viride sont employées au Japon (TOYAMA 126) pour faciliter le pelage des oranges et des mandarines, augmenter le rendement de l'extraction de l'agar-agar à partir des algues, ramollir les aliments fibreux comme les carottes, digérer les parois alimentaires des végétaux. Associées aux préparations d'Aspergillus niger et orizae, elles permettent d'obtenir par fermentation une liqueur à partir des fèves de soja (SHINICHIRO AKATSUKA et coll. 117).

Mais la principale et la plus ancienne application des cellulases se trouve dans le domaine pharmaceutique. En effet, la cellulase a été proposée dès 1931 par GRASSMANN et RUBENHAUER (39) comme thérapeutique

d'appoint pour favoriser la digestion des aliments végétaux crus. SILBERSCHMIDT (118) établit que la dose thérapeutique ne cherchait pas à provoquer une hydrolyse complète de toutes les liaisons osidiques, mais avait pour but de dissocier les parois cellulaires. Ainsi, ces préparations amoindrissent l'action irritante que provoquent les polysaccharides insolubles sur l'intestin. En outre, le clivage des glucides restreint les fermentations intestinales, d'où l'indication de ces enzymes dans le météorisme. Depuis cette époque, de nombreuses spécialités pharmaceutiques renfermant des cellulases et hémicellulases ont été introduites sur le marché. Ces enzymes ont des origines diverses. Aussi un protocole pour l'analyse des matières premières est nécessaire. Le problème de dosage des cellulases en général, et des cellulases employées en pharmacie en particulier, rencontre des difficultés dues :

' - au choix d'un substrat adéquat.

En effet, s'il est logique de penser à la cellulose naturelle pour doser les cellulases, il est en fait difficile de l'utiliser dans tous les cas. Toutes les cellulases n'attaquent pas ce substrat insoluble mais hydrolysent d'une façon plus ou moins poussée les dérivés de la cellulose. Dans les rares cas où la cellulose est dégradée, les modifications qui en résultent : pertes de poids, baisse du degré de polymérisation, production de saccharides réducteurs, sont faibles et leur détermination quantitative précise est malaisée. De plus, ce substrat théoriquement idéal est très différent dans sa composition chimique et son état physique des parois cellulaires des végétaux dont la dissociation doit être assurée par les cellulases.

' - Les préparations sont assez impures.

Les cellulases s'y trouvent associées dans des proportions non

négligeables à d'autres enzymes : β-glucosidase, α-amylase, protéases, etc... Une quantité variable de polysaccharides du type des dextrines provient du milieu de culture; elle n'est pas éliminée par une purification partielle; ces saccharides sont susceptibles d'être attaqués par les enzymes présents. Aussi le dosage des cellulases utilisées en pharmacie ne peut être réalisé avec la même rigueur que celui d'un enzyme purifié.

Dans le cadre de nos recherches sur les cellulases, nous avons été amené à étudier le substrat pour enzymes cellulolytiques et le dosage des cellulases utilisées en pharmacie. Certains dérivés de la cellulose, s'ils ne représentent pas le substrat que l'on rencontre à l'état naturel, ont l'avantage d'être solubles dans l'eau, donc facilement maniables, d'être bien attaqués par les enzymes, d'où détermination quantitative aisée de leur attaque par ces enzymes.

Deux dérivés solubles de la cellulose ont été étudiés : la carboxyméthylcellulose (CMC) et l'hydroxyéthylcellulose (HEC). Pour chacun de ces dérivés, une méthode de préparation à partir de la cellulose, réalisable au laboratoire, a été mise au point et a permis d'obtenir des produits de composition constante.

Le contrôle du produit obtenu, par des dosages chimiques et des déterminations physiques, assure son identité.

Enfin, ces substrats sont hydrolysés par différentes préparations cellulasiques du commerce, et l'évaluation précise de l'activité cellulasique est réalisable par viscosimétrie dans des conditions opératoires déterminées.

Avant d'exposer les résultats de notre travail, nous voudrions exprimer notre profonde gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS qui, en nous accueillant dans son laboratoire, nous a inculqué une rigoureuse discipline scientifique. Nous ayant proposé notre sujet de thèse, il n'a cessé d'en suivre le développement avec vigilance et sollicitude. Nous le remercions enfin d'avoir bien voulu accepter de présider le jury de notre thèse.

Nous remercions respectueusement Monsieur le Professeur P. FLEURY qui a toujours montré beaucoup de bienveillance à notre égard.

Nous adressons notre respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur P. LARUELLE, qui nous a fait l'honneur de prêter attention à notre travail et d'accepter de le juger.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur F. PERCHERON, qui nous a témoigné un intérêt constant tout au long de ce travail et nous a prodigué ses conseils judicieux et avisés. En acceptant de faire partie de notre jury, il nous a donné une nouvelle preuve de sa bienveillance à notre égard.

Enfin, tous nos remerciements vont à Madame A. de GRANDCHAMP, Docteur ès-Sciences, pour les conseils précieux qu'elle a bien voulu nous donner, et notre sincère amitié à nos camarades du laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

-o-

G E N E R A L I T E S

-o-o-o-

CELLULOSES ET HEMICELLULOSES

-o-o-o-

La cellulose est le principal constituant des parois cellulaires des plantes. Comme tout produit naturel, elle est susceptible d'être dégradée par des microorganismes : champignons, bactéries et même par diverses préparations d'origine animale.

La chimie de la cellulose commença en 1838 avec les travaux d'ANSELME PAYEN (92). Ce dernier constata que les parois cellulaires des végétaux ne sont pas constituées par une seule substance, spéciale à chaque espèce mais qu'elles sont incrustées de lignine (un polymère du phénylpropane de nature aromatique) dont la teneur varie selon l'espèce et l'âge des végétaux. Les résultats de ses analyses lui ont permis ensuite de conclure que seul, chez les jeunes plantes, le tissu fibreux est formé d'une substance unique, dénommée cellulose, provenant de la condensation des molécules de glucose.

La cellulose représente 40 à 60 p. 100 du tissu du bois, 80 à 90 p. 100 des fibres de lin et de ramie et 95 p. 100 de celles du coton NORKRANS (87). La structure moléculaire de la cellulose est la même chez le coton et le bois. La différence réside dans la longueur des fibres, la proportion de substances non cellulosiques qui l'accompagnent : hémicelluloses, lignine et pectines.

a) - Structure chimique de la cellulose :

La cellulose est connue comme un haut polymère formé par des chaînes linéaires d'anhydro β-D-glucopyranose. Le développement des

méthodes d'étude des sucres, la méthode de méthylation (IRVINE 54) ont déterminé les positions des hydroxyles libres en 2, 3 et 6

L'étude des macromolécules en solution par la mesure de la viscosité associée à l'ultracentrifugation a permis de connaitre la longueur des chaines de cellulose qui est exprimée par le degré de polymérisation (DP) ou nombre d'unités d'anhydroglucose par molécule de cellulose. Le DP varie selon l'origine de la cellulose : 10.000 dans les fibres de coton non dégradé; 1.000 à 3.000 dans les linters de coton purifié; 600 à 1.000 dans les fibres de bois; 200 à 600 dans la cellophane, 250 dans l'hydrocellulose (HALLIWELL 43)

Le spectre d'absorption dans l'infra-rouge a établi la nature β-glucosidique des liaisons (à 891 ± 7 cm^{-1} l'absorption des composés β-glucosidiques est maximale alors que celle des dérivés α-glucosidiques est nulle) (BARKER et coll.6)

b)- Structure physique et constituants des fibres de cellulose :

La distribution des différents constituants à l'intérieur des fibres de cellulose a été particulièrement étudiée par LANGE (69), MEIER (78), WARDROP (132), SULTZE (123) et KALMES (63)

On appelle holocellulose, l'ensemble des constituants polysaccharidiques des fibres de cellulose. Elle se compose d'α-cellulose, fraction insoluble dans la soude à 17,50 p.100 et d'hémicelluloses, fraction soluble dans cette même solution de soude.

Les fibres de cellulose de coton renferment 89 p.100 d'α-cellulose et 5 p. 100 d'hémicelluloses alors que celles du bois renferment chez le bouleau par exemple 44,9 p. 100 d'α-cellulose et 32,70 p. 100 d'hémicelluloses (COWLING 22), A l'examen au microscope électronique, les fibres de cellulose du coton comme celles du bois présentent la même structure

(ROLLINS 109; ROLLINS et TRIPP 110; TRIPP et ROLLINS 129)

Une coupe transversale montre de l'extérieur vers le centre :

- une paroi primaire (primary wall), mince (0,1 μ dans les fibres de coton et 0,5 μ dans les fibres de bois)

On y trouve des substances non cellulosiques : cires, pectines et hémicelluloses associées à des microfibrilles de cellulose.

- une paroi secondaire (secondary wall) divisée en trois couches qui se différencient par l'orientation des microfibrilles. L'épaisseur moyenne de cette paroi est d'environ 4 μ

- un lumen central

La concentration en hémicelluloses va en diminuant de la paroi primaire au lumen alors que celle de l'α-cellulose va en croissant.

Le coton est formé par un seul type de fibres. Le bois est constitué par une association de fibres différentes liées les unes aux autres par une substance non cellulosique composée de pectines, d'hémicelluloses et de lignine.

A l'intérieur des microfibrilles, la disposition des chaînes de cellulose est révélée par la diffraction des rayons X : la cellulose serait constituée par un réseau à trois dimensions. Le long de l'un des trois axes, les liaisons principales osidiques relient entr'elles les unités d'anhydroglucose. Le long des deux autres axes, les liaisons secondaires : liaisons hydrogène et liaisons de Van der Waals maintiennent les unités de glucose strictement parallèles les unes aux autres, conférant ainsi une structure cristalline à la cellulose.

A côté de ces régions cristallines, se trouvent des régions amorphes où les chaînes de cellulose ne sont pas ordonnées selon une orientation fixe.

De par sa structure cristalline, sa constitution de polymère polaire, la cellulose est d'une remarquable insolubilité.

Structure des hémicelluloses :

Dans les parois cellulaires, les chaînes de cellulose sont enchevêtrées dans celles des hémicelluloses et de pectines (PRESTON 100).

Les hémicelluloses sont représentées par un mélange de polysaccharides autres que la cellulose dont la plupart sont insolubles dans l'eau, solubles dans une solution de soude à 17,5 p. 100, plus aisément hydrolysables par les acides que la cellulose.

En 1960, ROUDIER (111) divise les hémicelluloses en trois groupes principaux :

- celles dont la structure principale est constituée par des unités de xylose : xylanes, glucuronoxylanes, glucuronoarabinoxylanes.

- celles dont la structure principale est riche en mannose : glucomannanes, galactoglucomannanes.

- celles dont la structure principale est constituée d'unités de galactose : arabinogalactanes, glucuronoarabinogalactanes.

Les hémicelluloses comprennent ainsi des polysaccharides mixtes à côté de polysaccharides homogènes tels que : mannanes, galactanes, glucanes, arabanes. Elles sont constituées essentiellement par des liaisons β-glucosidiques non branchées.

-o-

ENZYMES CELLULOLYTIQUES

-o-o-o-

La cellulase est désignée par la Commission des enzymes de l'Union internationale de Biochimie (107) comme une β(1→4)4 glucanohydrolase et indexée par 3.2.1.4. dans la classification des enzymes. Elle est définie ainsi comme hydrolysant les liaisons β(1→4)glucosidiques des polymères de β(1→4)D glucose ou celluloses.

Les sources les plus importantes de cellulases se trouvent chez les microorganismes et celles beaucoup moins importantes ont été signalées dans le règne végétal et animal.

A) - ORIGINES DES CELLULASES :

Cellulases du règne végétal.

Si la dégradation du bois est provoquée chez les plantes âgées par des moisissures, champignons et insectes, la cellulase d'origine endogène pourrait jouer un rôle dans la plasticité des plantes en période de croissance (TRACEY 128).

En 1950, TRACEY en examinant diverses plantes, a révélé la présence de cellulases dans un certain nombre d'entr'elles : racines de Beta vulgaris, fruits de Cucurbita pepo, feuilles de Phaseolus vulgaris, et dans différentes parties de plants de tabac (127).

Plus tard, REESE et MANDELS (104)ont extrait cet enzyme des tiges et feuilles de 6 espèces de plantes dont en particulier le Taraxacum officinalis et l'Oxalis sp.

Plus récemment, DER FONG FAN et coll. (25) ont trouvé que la

cellulase intervient dans le processus de développement de jeunes plantules de pois, où la vitesse de sa synthèse est liée à la concentration en auxine.

La cellulase des tomates a été étudiée par HALL et MULLINS d'une part (42), et par DICKINSON et MAC COLLUM d'autre part (27).

Le processus de germination de l'orge et du malt se ferait par l'intervention de la cellulase dont la quantité augmente pendant cette période (ENEBO et coll. 28).

Cellulases du règne animal :

L'existence de cellulases animales a été l'objet de maintes controverses.

Cependant, un insecte comme l'Argentine (Ctenolepisma lineata), élevé de façon stérile élabore de la cellulase (LASKER et GIESE 70).

Selon KARRER, l'escargot élabore sa cellulase, et selon MYERS et NORTHCOTE (81), cet enzyme proviendrait en partie de l'escargot et en partie des bactéries symbiotiques.

Chez la Blatte (Periplenata americana), la cellulase aurait aussi une double origine : elle est secrétée par les glandes salivaires et produite également par les hôtes symbiotiques de l'intestin de l'insecte (WHARTON et LOLA 133).

Les mollusques Dolabella et les écrevisses produisent leur propre cellulase qui a été décelée dans le suc de l'hépatopancréas (OKADA et coll. 90 ; KOOIMAN 68).

Les insectes xylophages des espèces : Ips typographus, Pissodes notatus, Scolytus intricatus, Hylobius abietis, et Capnodis milliaris de l'ordre des Coléoptères, possèdent de multiples enzymes dont certains sont capables d'hydrolyser les hémicelluloses et les dérivés de la cellulose (COURTOIS, CHARARAS et DEBRIS 17 , 18 ; COURTOIS, CHARARAS,

DEBRIS et LAURANT-HUBE 19 ., 20). Des essais ont été réalisés sur l'une de ces espèces : les larves de Capnodis miliaris pour connaître la provenance de ces enzymes. La nutrition de ces larves en présence, soit d'un sulfamide, soit d'un mélange de 4 antibiotiques à spectre antibactérien étendu (18) : chloramphénicol, transcycline, pénicilline, et kanamycine, soit en présence d'un antifongique : l'hamycine (10), n'a pas modifié de façon appréciable l'activité de ces enzymes. Ces enzymes paraissent bien être élaborés par l'insecte.

Cellulases d'origine bactérienne :

Les bactéries productrices de cellulases sont nombreuses. La revue de GASCOIGNE and GASCOIGNE (37) réunit les principales espèces. Citons parmi les bactéries aérobies du sol : les Cytophaga (FAHREUS 30 ; CHARPENTIER 11), les Pseudomonas fluorescens (UEDA et coll.130); parmi les bactéries anaérobies des marécages : Cellulomonas sp. (HAMMERSTROM et coll. 47) et les bactéries de la panse des ruminants (POCHON 98 ; SIMOLA 119).

Cellulases d'origine fongique :

La plupart des préparations utilisées en pharmacie proviennent de cultures de moisissures : d'Aspergillus orizae, niger ou oureus, de Penicillium funiculosum, parvum ou pusillum.

Les cellulases de Trichoderma viride sont utilisées au Japon pour augmenter le rendement de l'extraction de l'agar agar, des jus de fruits (126), etc.

Les différentes espèces de Basidiomycètes par leurs cellulases associées à leurs pectinases, attaquent le bois et causent le dépérissement des plantes (NORKRANS 87).

Les cellulases de Myrothecium verrucaria ont été l'objet de

nombreuses recherches à l'étranger (REESE 104 , WHITAKER 134).

Les cellulases fongiques sont considérées en général comme des enzymes induits, mais il semble que dans certains cas, leur production peut se faire en l'absence de cellulose ou de dérivés cellulosiques (LYR 73).

Les préparations commerciales sont souvent obtenues par des méthodes analogues à celle utilisée pour extraire la Takadiastase de l'Aspergillus orizae : le filtrat de culture et l'extrait aqueux du mycélium sont traités par des solvants organiques miscibles à l'eau (éthanol, acétone, etc...). Le précipité que l'on sépare est une préparation brute contenant de multiples enzymes : α-amylase, invertase, α et β-glucosidases, α et β-galactosidases, xylanases, pectinases, protéases associés aux cellulases.

La précipitation par les solvants organiques entraîne aussi l'insolubilisation des polysaccharides du milieu de culture : c'est ainsi que l'on trouve dans des préparations cellulasiques du commerce une forte proportion de glucides.

B) - MODES D'ACTION DES CELLULASES :

L'activité cellulasique est imputée à un seul enzyme par WHITAKER (136) alors qu'elle serait due au moins à 2 enzymes selon REESE et coll. (106), JERMYN (57), PETTERSON et PORATH (95), SELBY et coll. (115) MILLER et BLUM (79).

Pour WHITAKER qui a étudié l'action de la cellulase purifiée de Myrothecium verrucaria, les arguments venant à l'appui de son hypothèse sont : l'homogénéité à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation de l'enzyme purifié. Au cours de la purification les activités vis-à-vis

de divers substrats augmentent de façon similaire. Ces substrats sont : les linters de coton gonflés par l'acide phosphorique, les linters de coton broyés, la CMC, et divers oligo β-glucosides.

Pour REESE, l'explication au fait observé que les microorganismes cellulolytiques utilisant la cellulose modifiée dans leur milieu de culture ne poussent pas tous sur substrat insoluble tel que la cellulose cristalline est qu'il existe au moins 2 types d'enzymes concourant à l'hydrolyse de la cellulose native. Au premier il a donné le nom de C_1, au second le nom de C_x. C_1 transformerait la cellulose cristalline en chaînes linéaires d'anhydroglucose et C_x dépolymériserait ces chaînes.

Pour SELBY, les 2 enzymes intervenant dans l'attaque de la cellulose sont désignés par A et B. L'enzyme A est à rapprocher du facteur C_1 de REESE. Il attaque les fibres de cellulose en provoquant une diminution supérieure à 15-20 p. 100 de la résistance à la traction. Cet enzyme A est inductible et fortement adsorbé sur la cellulose insoluble du milieu de culture. L'enzyme B est actif sur CMC et représente donc le facteur C_x.

Pour MARSH et coll. (76), l'attaque initiale des fibres de cellulose est due à un facteur qui provoque le gonflement de ces fibres dans une solution de soude à 18 p. 100. Il l'a appelé le "S factor" ou Swelling factor. Ce facteur S a été obtenu récemment en même temps que l'enzyme A de SELBY à partir d'une préparation cellulasique provenant d'une culture sur milieu solide. Il n'a pas été démontré si ce "S" factor serait l'enzyme A.

L'enzyme C_x est également dénommé enzyme B ou carboxyméthylcellulase (on le désigne ainsi par le nom du substrat qui a été utilisé pour le tester); le terme β-glucanase 1→4 est un nom plus général. La préparation enzymatique C_x serait constituée par plusieurs enzymes qui ont été séparés par chromatographie et électrophorèse (38, 48, 74, 79).

Il a été suggéré que la divergence de point de vue concernant le mode d'action des cellulases entre WHITAKER d'une part et les autres chercheurs d'autre part, proviendrait de la présence de l'enzyme sous forme de complexe avec les polysaccharides. Et c'est la partie saccharidique et non la fraction protéique qui conditionne le comportement de l'enzyme à la chromatographie (87).

Cette suggestion rejoint par ailleurs celle de SELBY qui pense que son enzyme A qui s'inactive rapidement pendant l'attaque des fibres de cellulose se serait combiné avec les produits de la cellulolyse pour donner l'enzyme B (116).

Les études faites par JERMYN sur la β-glucosidase de Stachybotrys atra semblent confirmer cette hypothèse. En effet, selon les conditions de culture, on peut obtenir par chromatographie un ou plusieurs enzymes ayant la même partie protéique mais se différenciant par la quantité de polysaccharide entrant dans la composition du complexe (JERMYN 58). Ces complexes protéine-polysaccharide se rencontrent d'ailleurs avec d'autres enzymes (NORKRANS 87).

C) - CHOIX DU SUBSTRAT :

La cellulose native n'est pas facilement attaquée par les enzymes. Cette résistance serait due selon COWLING (22)-à la forte adsorption de l'enzyme sur la surface des fibres, d'où résulte une lente diffusion de l'enzyme,

- au passage difficile de l'enzyme à l'intérieur des fibres par l'intermédiaire des régions dites amorphes,

- à la présence des zones cristallines.

En effet, comme dans tout mécanisme enzymatique, un contact physique direct entre l'enzyme et son substrat est nécessaire. Sur la surface des fibres, la forte adsorption de l'enzyme par son substrat a été mise en évidence par REESE et NORKRANS. Dans ses essais de purification de cellulase, REESE a trouvé qu'il était nécessaire de traiter le papier utilisé pour la chromatographie par une solution de zéine à 4 p. 100 ou une solution de gélatine à 1 p. 100 afin d'éviter l'adsorption irréversible de l'enzyme (106).

NORKRANS (86) constata que la dialyse dans des tubes de cellophane diminuait de 25 p. 100 l'activité cellulasique du filtrat de culture de Tricholoma.

A l'intérieur des fibres, le contact direct entre l'enzyme et le substrat ne peut se faire que si l'enzyme arrive à atteindre les liaisons osidiques. Les cellulases sont en général des protéines de grand poids moléculaire. La cellulase de Trichoderma viride est une protéine globulaire d'un PM voisin de 63.000 selon WHITAKER (135), celles de Polyporus versicolor ont des poids moléculaires s'étageant de 11.000 à 51.000 selon PETTERSON (94).

Leurs tailles n'ont pas été définies, mais elles seraient supérieures à la largeur des capillaires et aux espaces situés entre les microfibrilles dans les régions amorphes de la cellulose, endroits où pourrait se faire la diffusion de l'enzyme à l'intérieur des fibres.

L'influence du degré de cristallinité des fibres de cellulose a été étudiée par WALSETH et NORKRANS parmi d'autres auteurs. En utilisant des échantillons de cellulose gonflée de façon différente par l'acide phosphorique, WALSETH (131) a montré que les échantillons les plus résistants sont ceux qui ont les structures les plus cristallines.

NORKRANS (85) est arrivé à la même conclusion en étudiant par la diffraction des rayons X l'attaque enzymatique de la cellulose régénérée à partir d'une solution cupriammonique.

Dans les fibres de bois, la lignine est intimement liée à la cellulose, ce qui constitue un facteur diminuant l'accessibilité de ces fibres à l'enzyme (96). Si l'on arrive à isoler la cellulose du bois, on obtient un produit qui est totalement hydrolysé par les cellulases commerciales ([illegible] 97).

Les fibres de cellulose du coton et du bois, telles que nous venons de les décrire, sont en réalité très différentes des parois cellulaires des végétaux qui représentent le substrat que les préparations enzymatiques de cellulases et hémicellulases employées en Pharmacie (cellulases Pharm.)* doivent dégrader. Leur DP et leur degré de compacité sont très supérieurs à ceux de [illegible] celluloses des végétaux alimentaires. C'est pourquoi, les cellulases Pharm. presque inactives sur le coton, sont capables de dégrader les celluloses des aliments.

Mais dans l'état actuel des choses, il est impossible d'envisager une cellulose végétale comme substrat. La séparation de la cellulose de la matrice où elle est enchevêtrée avec la lignine, les hémicelluloses et les substances pectiques exige l'intervention d'agents chimiques drastiques : chlore, [illegible] chlorés pour détruire la lignine, solutions alcalines chaudes pour dissoudre les hémicelluloses. La cellulose que l'on obtient a subi une dégradation poussée et diffère de la cellulose

---

* Nous emploierons dans la suite de notre texte l'expression condensée de cellulases Pharm. pour désigner les préparations enzymatiques de cellulases et hémicellulases employées en pharmacie.

naturelle végétale (TRELL 124).

Pour augmenter l'accessibilité de la cellulose à l'attaque enzymatique, on a eu recours à des traitements physiques : broyage par un appareil à vibrations, ou à des traitements chimiques : gonflement par l'acide phosphorique ou par un alcali, ou encore fabrication des éthers-oxydes solubles tels que méthylcellulose (MC), carboxyméthylcellulose (CMC), hydroxyéthylcellulose (HEC).

Les substrats insolubles, modifiés par gonflement dans l'acide phosphorique ont été utilisés par WALSETH, MYERS et NORTHCOTE, GILLIGAN et REESE, WHITAKER.

L'attaque enzymatique de ce substrat a été évaluée soit par la détermination de la diminution du DP de la cellulose résiduelle (WALSETH 131), soit par le dosage des sucres réducteurs libérés (WHITAKER135 ; MYERS et NORTHCOTE 81), soit par le dosage de la cellulose résiduelle par oxydation par le bichromate dont l'excès peut être dosé colorimétriquement (HALLIWELL 43) ou titré en retour par iodométrie.

Les cellodextrines ont été utilisées par WHITAKER (138) et l'attaque enzymatique déterminée par le dosage des sucres réducteurs libérés.

De nombreux auteurs ont utilisé comme substrat la cellophane, cellulose régénérée à partir d'une solution alcaline de xanthogénate de cellulose (CONCHIE 13; FESTENSTEIN 31). Les sucres réducteurs libérés sont dosés, ou la cellophane non attaquée est pesée.

Les éthers-oxydes de la cellulose utilisés pour le dosage des cellulases sont : la MC, la CMC, l'HEC.

Les enzymes qui dépolymérisent ces substrats provoquent la diminution de la viscosité de leur solution aqueuse et la libération des sucres réducteurs. Ces deux propriétés sont utilisables pour apprécier

l'activité cellulasique.

La MC a été employée par AITKEN et coll. (2), par REESE et coll. (105), par DESARMENIEN et BASTIEN (26).

La CMC est plus largement utilisée (REESE et coll.105) en I950, JERMYN en I952 (59), HALLIWELL en I953 (46),NISIZAWA et coll. en I959 (84) parmi d'autres auteurs.

L'HEC a servi de substrat à REESE et coll. en I950 (104) à BLUM et coll. en I952 (8), et à IWASAKI en I964 (55) etc...

La cellophane comme les dérivés solubles de la cellulose est produite par l'industrie. Il en existe différentes sortes qui sont largement utilisées pour des usages industriels, mais qui ne présentent pas un degré de pureté suffisant pour servir de substrat de composition constante. Les travaux de SPIK et MONTREUIL (121) ont en effet montré que certaines cellophanes du commerce contiennent une quantité assez importante de xylanes.

Les dérivés solubles de la cellulose sont en général bien attaqués par les enzymes : il s'ensuit une sensibilité plus grande pour le dosage.

Ils permettent de plus la saturation de l'enzyme par son substrat durant la période d'incubation, ce qui représente une condition essentielle dans un dosage enzymatique.

Mais l'introduction des substituants sur la molécule la rend moins sensible à l'action des enzymes à partir d'un certain nombre de substituants (DS) par unité d'anhydroglucose. Un dérivé qui porte un substituant uniformément sur toutes les molécules de glucose est complètement résistant aux enzymes. Il est donc nécessaire d'employer un dérivé ayant un DS constant et déterminé.

Les CMC et HEC vendues dans le commerce diffèrent par leurs DS.

Aussi le but que nous nous sommes proposé est de préparer au laboratoire, à partir de la cellulose pure, ces 2 dérivés et d'en étudier l'attaque par les cellulases du commerce.

Les caractéristiques du produit comme le DS ou le rapport de glucose non substitué par unité d'anhydroglucose ont été auparavant déterminées par des dosages chimiques.

-o-o-o-

P R E M I E R E P A R T I E

—o—o—o—

TECHNIQUES GENERALES UTILISEES

-o-o-o-

La description des techniques d'obtention de la CMC et de l'HEC figurera dans la deuxième partie du travail. L'hydrolyse de ces dérivés par les cellulases du commerce sera traitée dans la troisième partie.

Nous décrivons dès maintenant les techniques générales qui ont été utilisées pour le dosage de la CMC et de l'HEC : oxydation nitrochromique, oxydation periodique; et celles qui ont servi à déterminer l'activité des enzymes : dosage des sucres réducteurs totaux ou du glucose libérés, détermination de la viscosité.

Les techniques qui ont été employées plus spécialement au dosage de la CMC ou de l'HEC seront décrites dans les parties consacrées à chacun de ces produits.

I) - OXYDATION PERIODIQUE :

L'acide periodique est un réactif souvent employé pour doser les polysaccharides ou pour déterminer leur structure; il permet de fixer les proportions de groupements α-glycols libres en positions 2 et 3 des chaînes d'anhydroglucose de la CMC et de l'HEC.

En effet, pour des produits substitués dont le DS est inférieur à 1, la substitution ne se fait pas uniquement sur les carbones 6. Selon JONES (60), la réactivité relative des hydroxyles en positions 2 : 3 : 6 est de 3 : I : IO dans la réaction d'éthérification conduisant à l'obtention de l'HEC. Elle serait en revanche de I : I : I selon SPURLIN (122). Dans la réaction d'éthérification conduisant à l'obtention de la CMC,

elle serait de 2 : I : 2,5 (60).

L'oxydation periodique a été employée par COHEN et HAAS (12) pour déterminer la proportion de groupements α-glycols libres en position 2 et 3 de différents échantillons d'HEC commerciaux.

Nous utilisons le protocole qui a servi dans notre laboratoire : oxydation à 4°, à l'obscurité.

L'oxydation est faite en fonction de différentes doses de substance à oxyder (pour vérifier la régularité de la réaction), et en fonction de la durée de l'oxydation.

La CMC sodique précipite de sa solution aqueuse par tous les acides minéraux. Pour l'oxyder, nous utilisons une solution d'acide paraperiodique partiellement neutralisée par la soude N/I jusqu'à pH 4,5 (PI).

L'HEC est oxydée par une solution d'acide paraperiodique libre.

L'acide periodique est à une concentration de 0,125M dans le milie Nous utilisons une solution de CMC à 0,75 p. 100,(soit environ 0,035M en anhydroglucose), et l'HEC en solution à 1 p. 100 (soit environ 0,035M en anhydroglucose).

Après des durées de contact variables, les quantités d'acide periodique réduit sont déterminées sur une partie aliquote de la solution par la méthode indirecte à l'iode-anhydride arsénieux (FLEURY et LANGE 36).

L'acide monovalent provenant de l'oxydation du groupement aldéhydique du polysaccharide (quand il y a superoxydation) est dosé par acidimétrie (41).

II) - <u>OXYDATION NITROCHROMIQUE</u> :

L'analyse élémentaire des composés organiques par la combustion

complète n'est pas à la portée de tous les laboratoires. Aussi, l'oxydation de ces composés par voie humide utilisant le "mélange chromique" a souvent été utilisée.

En 1958, HALLIWELL (44) a dosé par le réactif sulfochromique, la cellulose résiduelle non attaquée par une cellulase.

En 1963, AGARWAL(1) a réalisé l'oxydation intégrale de la cellulose par l'acide chromique en présence d'oxydes métalliques agissant comme catalyseurs.

La solution nitro-chromique qui permet une oxydation plus régulière que le mélange sulfochromique (CORDEBARD 15, 16) a été employée pour doser les composés aliphatiques tels que : méthanol, éthanol, acide β-hydroxybutyrique, acides-alcools(ANAGNOSTOPOULOS et coll.3;FLEURY et coll.32).

Nous avons voulu, par cette méthode, contrôler les résultats donnés par d'autres techniques de dosage, et voir si le mélange nitrochromique permettait de doser régulièrement les dérivés de la cellulose.

Réactif :

Le réactif oxydant appelé mélange nitrochromique est constitué par une solution de bichromate de potasse dans l'acide nitrique pur (densité : 1,394 - 40° B.).

La solution décinormale contient 4,9 g de bichromate par litre. Conservé à l'abri de la lumière et des poussières, ce réactif évolue durant les premières 24 heures et demeure ensuite très stable.

Mode opératoire :

Le principe consiste à faire réagir la substance à doser avec un excès connu de réactif nitrochromique. Après réaction, le volume de

solution chromique en excès est déterminé par un dosage en retour :l'excès de bichromate libère à partir d'une solution d'iodure de potassium l'iode qui est titré par le thiosulfate.

Comme pour l'oxydation periodique, la régularité de la réaction est contrôlée par l'oxydation de plusieurs doses de dérivés cellulosiques. L'influence de la durée de réaction est étudiée à la température du bain-marie bouillant, l'oxydation à froid progressant trop lentement.

Dans des fioles à rodage, nettoyées avec le mélange nitro-chromique, nous introduisons :

1 ml de solution de CMC ou d'HEC à 2 p. 1000

8 ml de mélange nitro-chromique 0,1 N environ.

Un témoin réactif est constitué en remplaçant le volume de substance à oxyder par le même volume d'eau distillée.

Après des durées d'oxydation variables, (allant de 1 à 5 heures) au bain-marie bouillant, sous réfrigérant ascendant, les solutions sont refroidies par un courant d'eau froide et diluées avec 40 ml d'eau distillée afin que le titre final en acide soit d'environ 2N. Nous ajoutons alors 5 ml d'une solution d'iodure de potassium à 20 p. 100. Après 5 minutes de repos, l'iode libéré est titré par le thiosulfate 0,1N.

III) - DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS LIBERES PAR LES CELLULASES

Les sucres réducteurs totaux libérés par les enzymes sont dosés :

- soit par la méthode colorimétrique utilisant le réactif cupro alcalin de SOMOGYI-NELSON (120, 82).
- soit la méthode colorimétrique adaptée à l'autoanalyseur Technicon, utilisant la réduction du ferricyanure de potassium en milieu alcalin (méthode d'HOFFMAN modifiée 50)..

a) - Méthode utilisant le réactif de SOMOGYI-NELSON

Le dosage est fait en 2 étapes :

Réduction à chaud (20 minutes au bain-marie bouillant) du réactif cupro-alcalin de SOMOGYI par les oses en oxyde cuivreux.

Réduction à froid par l'oxyde cuivreux du réactif arséniomolybdique de NELSON, donnant un complexe bleu dont l'absorption est évaluée au spectrophotomètre à 650 nm.

Le réactif cuivrique est stabilisé par la présence de sulfate et de tartrate. Sa réduction dépend : de l'alcalinité du milieu, et de la nature des sucres.

Le dosage se fait donc comparativement à une courbe d'étalonnage et pour des quantités de sucres évaluées en glucose comprises entre 50 et 200 µg, l'intensité de la coloration suit la loi de BEER.

b) - Méthode utilisant le ferricyanure de potassium.

C'est une modification de la méthode manuelle d'HOFFMAN (50).

On utilise la réaction d'oxydo-réduction du ferricyanure en ferrocyanure : la solution jaune de départ est décolorée au fur et à mesure de la réduction.

L'absorption de la coloration est mesurée à 420 nm dans une cuve du colorimètre à flux continu.

En variant les concentrations du réactif au ferricyanure, on peut déterminer jusqu'à 1g par litre de sucres réducteurs exprimés en glucose. Le dosage est fait comparativement à une gamme étalon.

IV) - DOSAGE DU GLUCOSE PAR LA GLUCOSE-OXYDASE.

La glucose-oxydase a été décrite par MULLER (80) et sa spécificité étudiée par KEILIN et HARTREE (64 ,65).

La glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du β-D glucose en acide gluconique et eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée oxyde un chromogène : l'orthodianisidine en un composant coloré en brun rouge.

La réaction est quantitative, et dans nos conditions opératoires avec des quantités de glucose ne dépassant pas 100 µg par prise d'essai, l'intensité de la coloration suit la loi de BEER.

Réactif :

75 mg de GOD de la Nutritional Biochemical Corporation (NBC) et 2 mg de peroxydase (Fluka AG) sont dissous dans environ 100 ml de tampon phosphate disodique, 0,12M. On ajoute, en agitant, 1 ml d'une solution acétonique d'orthodianisidine à 5 p. 1000. On ramène le volume final à 150 ml avec le tampon. La solution est préparée une heure avant l'emploi et se conserve à 4° dans des flacons bouchés émeri, colorés. Le réactif est ainsi stable pendant 2 semaines.

Dans des tubes à essai de 10 ml, on ajoute :
une prise d'essai de 0,5 ml contenant au maximum 100 µg de glucose et 5 ml du réactif à la glucose-oxydase.

Une courbe d'étalonnage est établie en oxydant dans les mêmes conditions : 0,05 ; 0,10 ; 0,15 et 0,20 ml d'une solution de glucose à 0,50 g par litre.

Un témoin réactif est fait parallèlement en remplaçant la prise d'essai par de l'eau distillée.

Après mélange par retournement de tous les tubes, on laisse incuber pendant 30 minutes à la température du laboratoire, à l'obscurité. L'intensité de la coloration qui se développe est évaluée au spectrophoto-

mètre à 430 nm, contre le témoin réactif. L'oxydation du glucose est totale après 15 minutes d'incubation et la coloration que l'on obtient avec l'orthodianisidine est stable durant 1 heure.

V) - MESURE DE LA VISCOSITE :

a) - Définition de la viscosité :

Le phénomène de viscosité est très général et se manifeste pour tous les fluides, qu'ils soient liquides ou gazeux. Il est dû à l'action exercée par les molécules les unes sur les autres, une sorte de friction interne qui est d'autant plus importante que les molécules sont plus grosses et plus dissymétriques.

Dans un fluide au repos, toutes les forces internes s'équilibrent.

Soit maintenant 2 éléments de surface S, séparés l'un de l'autre par une distance dx. Si l'un des éléments est animé par une vitesse dv par rapport à l'autre, la force de friction F qui s'exerce sur les 2 éléments de surface S est proportionnelle à dv, et à S, inversement proportionnelle à dx

$$F = \eta \frac{dv}{dx} \times S$$

$$\text{ou } \eta \frac{dv}{dx} = F/S$$

η : coefficient de proportionnalité ou coefficient de viscosité

$\frac{dv}{dx}$: gradient de vitesse

$\eta \frac{dv}{dx}$: tension de cisaillement ou τ

$$\eta = \frac{\tau}{dv/dx}$$

Pour certaines substances, comme les huiles végétales, η est une

constante qui n'est modifiée que par la température : ces substances sont appelées "substances newtoniennes".

Pour d'autres, η dépend de τ ou de dv/dx : ces substances sont dites non newtoniennes.

Ces dernières sont représentées principalement par des polymères en solution, des macromolécules facilement déformables. L'écoulement de ces substances provoque l'orientation de leurs molécules, d'où résulte une baisse de viscosité. La valeur de la viscosité apparente est obtenue en extrapolant à gradient de vitesse nul.

b) - Appareils de mesure :

Tube capillaire :

Le liquide s'écoule dans le tube capillaire, sous l'effet d'une différence de pression entre les 2 extrémités du capillaire.

La formule de POISEUILLE donne :

$$v = \frac{\pi\, p.r^4}{\eta\, 8.l.}$$

v = volume de liquide écoulé par seconde

l = longueur du tube capillaire

r = rayon du tube capillaire

p = différence de pression entre les 2 extrémités du capillaire

η = coefficient de viscosité

En pratique, on détermine, sous la pression atmosphérique, le temps d'écoulement d'un volume v fixe de liquide. Le tube capillaire est étalonné auparavant par rapport à un liquide de viscosité connue, l'eau en général.

Les tubes capillaires exigent l'emploi de solutions limpides, les particules en suspension obstrueraient l'orifice capillaire. De nombreux appareils dans l'industrie sont basés sur ce principe : viscosimètre d'Engler, d'Ostwald, de Baume et de Vigneron.

Viscosimètre de type Couette

Nous utilisons, dans notre laboratoire, ce type de viscosimètre pour les mesures de viscosité (Rotovisko).

La substance dont on veut déterminer la viscosité remplit l'espace annulaire compris entre 2 cylindres coaxiaux dont l'un est fixe, l'autre en rotation. Pour faire tourner le cylindre intérieur à une vitesse déterminée, il faut lui appliquer un couple de rotation dont la valeur dépend de la viscosité de la solution. On mesure alors le moment de rotation qui se transmet au cylindre intérieur et qui se traduit par une déviation de l'aiguille du galvanomètre.

c) - Unités de viscosité

Dans le système C.G.S., l'unité de viscosité dynamique est la Poise (P). C'est la force exprimée en dynes qui s'exerce sur 1 cm^2 des 2 couches de liquide en contact, quand la vitesse croît de 1 cm/sec par cm

On utilise souvent le sous-multiple ou centipoise (cP) : 10^{-2}P.

Technique opératoire avec le viscosimètre à rotation

Dans les liquides, η décroît rapidement quand la température augmente. Aussi les mesures doivent être effectuées dans une enceinte rigoureusement équilibrée par un thermostat.

Pour des solutions assez peu visqueuses, comme celles que nous utilisons dans nos dosages enzymatiques, les grandes vitesses nécessaires pour mesurer la viscosité amènent un échauffement rapide de la solution, d'où il résulte que les mesures doivent être effectuées rapidement.

Pour réduire l'erreur relative provenant de la lecture des déviations de l'aiguille du galvanomètre, il faut choisir une concentration donnant une déviation comprise entre 50 et 100 (le cadran du galvanomètre est gradué en 100 divisions).

Nous avons, de plus, couplé cet appareil à un enregistreur universel Graphispot afin d'éliminer les erreurs de lecture.

Les mesures sont faites à 25° sur une solution aqueuse homogène de CMC ou d'HEC. La dissolution de ces 2 produits est réalisée dans de l'eau distillée chauffée vers 50°. Les solutions sont préparées 24 heures avant l'emploi pour permettre un gonflement homogène des fibres. Avant chaque mesure on agite vigoureusement la solution pendant 5 minutes pour remettre le produit en solution. En effet, un repos prolongé provoque un dépôt des particules de CMC et d'HEC.

Une prise d'essai voisine de 6,7 ml est nécessaire à chaque détermination. La durée de la mesure n'excède pas 15 secondes.

La viscosité est donnée directement par :

$$\eta = U.S.K. \text{ en cP.}$$

U = facteur de vitesse utilisé

K = constante de l'appareil

S = lecture faite au galvanomètre

Nous utilisons, à la place de la viscosité absolue la viscosité spécifique

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

η viscosité de la solution

η_0 viscosité du solvant (eau)

$$\text{soit : } \frac{U.S.K. - U.S_0K}{U.S_0K} = \frac{S - S_0}{S_0}$$

S_0 : lecture de la déviation galvanométrique due à l'eau

S : lecture de la déviation galvanométrique due à la solution

-o-o-o-

DEUXIEME PARTIE

C H A P I T R E I

PREPARATION - ESSAIS ANALYTIQUES DE LA CMC

-o-o-o-

I) - PREPARATION DE LA CMC :

La CMC est connue sous les désignations commerciales de Blanose (firme Novacel) en France, et de Cellofas B (de l'Imperial Chemical Industries Ltd) en Angleterre.

Elle figure à la Pharmacopée française de 1965 qui admet l'utilisation de diverses sortes couvrant une gamme étendue de viscosité .

Elle est utilisée dans l'industrie comme épaississant, gélifiant, stabilisateur d'émulsions, etc...

-o-o-o-

La CMC est obtenue par substitution d'un ou de tous les hydroxyles libres des unités d'anhydroglucose par un reste glycolyl. On la prépare le plus souvent en faisant réagir, en milieu alcalin, à chaud, l'acide monochloracétique sur la cellulose. La réaction est schématisable ainsi :

$$\text{Cell}(OH)^3 + n\ ClCH_2\text{-}COOH \xrightarrow{NaOH} \text{Cell}\begin{matrix}(O\text{-}CH_2\text{-}COONa)^n \\ (OH)^{3-n}\end{matrix} + n\ NaCl$$

Le DS ou nombre de substituants par unité d'anhydroglucose est exprimé en pourcentage. Les dérivés solubles dans l'eau sont ceux qui

ont un DS supérieur à 0,50. La viscosité comme la solubilité augmente avec le DS. Selon les proportions de réactifs utilisées, on obtient des CMC de DS différents.

a)- Purification de la matière première :

Nous avons utilisé le coton, car c'est actuellement la source de cellulose pure la plus répandue.

Le coton cardé est purifié selon le protocole décrit par CORBETT (14) : élimination des cires par un solvant organique, puis extraction des pectines par la soude.

Protocole opératoire :

Le coton cardé écru est découpé aux ciseaux en fragments de 5mm de longueur environ et placé dans un appareil à épuisement de SOXHLET. Les cires sont éliminées par un traitement de 18 heures avec du chloroforme, suivi d'un traitement de même durée avec de l'alcool à 95°.

Le coton obtenu est desséché sous vide jusqu'à poids constant.

L'extraction des pectines est réalisée par une solution de soude à 1 p. 100, à raison de 50 ml pour 1g de coton. L'opération se fait sous atmosphère d'azote, car en milieu alcalin, l'oxygène de l'air dégrade le polysaccharide (NEVELL 83). Nous utilisons un ballon à 2 tubulures. La tubulure centrale est munie d'un réfrigérant ayant à son extrémité un tube de sûreté à 2 boules rempli de mercure. La deuxième tubulure sert à faire rentrer un courant d'azote. Nous purgeons l'appareil en faisant passer un courant d'azote avant de porter le mélange à l'ébullition. Le traitement dure 8 heures à cette température.

Le coton est ensuite recueilli, lavé à l'eau distillée jusqu'à

ce que les eaux de lavage deviennent neutres à la phénolphtaléine. Le lavage se poursuit avec de l'acétone, de l'alcool à 95°, et enfin de l'éther; 250ml de chacun des solvants sont utilisés pour 5g de coton de départ.

Le coton est séché à l'air libre, puis sous vide.

b)- Condensation avec l'acide monochloracétique :

10 g de coton purifié sont découpés finement aux ciseaux et séparés en fibres par déchiquetage de dix minutes dans un turmix. Nous les introduisons dans le ballon à 2 tubulures et adaptons sur la tubulure centrale un agitateur mécanique, sur la tubulure latérale une ampoule à réactif. L'agitateur étant mis en marche, nous introduisons successivement : 400 ml d'isopropanol, puis 80 ml de soude à 30 p. 100, par petites portions durant 30 minutes. L'agitation dure une heure; les fibres de cellulose sont maintenues constamment immergées dans l'isopropanol. L'alcali-cellulose se présente sous l'aspect de fibres translucides.

Nous ajoutons alors par l'ampoule à réactif 14g d'acide monochloracétique, et maintenons l'agitation pendant une heure. Le mélange est ensuite transvasé dans une fiole conique de 500 ml que nous bouchons avec du papier d'aluminium et plaçons dans une étuve réglée à 60° pendant 4 h.

La CMC retient assez énergiquement les substances présentes dans le milieu : chlorure de sodium, glycolate de sodium, monochloracétate de sodium qui sont des sous-produits de la préparation. Aussi un lavage prolongé est nécessaire pour éliminer ces impuretés. Les fibres sont essorées sur Büchner, lavées avec du méthanol à 80° préalablement chauffé vers 50° jusqu'à ce que les eaux de lavage deviennent neutres à la phénolphtaléine et ne donnent plus de précipité avec le nitrate d'argent en milieu nitrique. Il faut environ 500 ml de méthanol. Nous trempons les fibres pendant une

heure dans du méthanol absolu et lavons ensuite avec 300 ml de méthanol absolu. Le séchage se fait à 60° pendant 12 heures, et le produit est gardé sous vide phosphorique.

Trois opérations distinctes nous ont fourni respectivement : I2,50 g - 12,50 g et 11,50 g de produit A.

En utilisant pour 10 g de coton, 300 ml d'isopropanol, 80 ml de soude à 30 p. 100 et 10 g d'acide monochloracétique dans les mêmes conditions opératoires que précédemment, nous obtenons : 11 g de produit B.

La CMC se présente sous forme de fibres, très hygroscopiques.

II) - ESSAIS ANALYTIQUES DE LA CMC :

La CMC est utilisée jusqu'à ce jour, comme excipient en Pharmacie. Le Codex recommande pour ses essais : la recherche de l'arsenic et des métaux lourds, ainsi que la détermination de la viscosité des solutions aqueuses.

Le contrôle de la CMC en tant que substrat pour enzymes cellulolytiques doit fournir les indications sur le DS du produit. En effet, lorsque le DS augmente, la sensibilité à l'attaque enzymatique diminue.

Cette détermination est complétée par :

une oxydation periodique qui indique la proportion de groupements α-glycols non substitués dans la molécule.

une oxydation nitrochromique qui représente un indice global caractéristique du produit.

-o-o-o-

Nos essais sont réalisés avec des échantillons provenant de préparations différentes des produits A et B. Nous avons d'autre part utilisé la [illegible] de la firme Novacel; ce produit a servi de substrat

dans notre laboratoire, lors des recherches sur les cellulases des insectes xylophages (COURTOIS, CHARARAS, DEBRIS et LAURANT-HUBE 19).

Les échantillons sont désséchés sous vide puis à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant avant chaque détermination. Sur ces échantillons désséchés, la méthode de FISCHER a permis de déceler 5,3 p. 100 d'eau.

A - Détermination du DS de la CMC :

Un grand nombre de méthodes ont été utilisées pour déterminer le DS de la CMC.

BROWN et HOUGHTON (9) ont décrit une méthode de dosage basée soit sur le titrage électrométrique de la forme acide de la CMC, soit sur la gravimétrie du résidu provenant de la précipitation de la CMC par les sels des métaux lourds : cuivre, argent, etc...

SAKURADA (113) préconisait le titrage potentiométrique ou conductométrique avec la soude, la calcination et pesée des cendres sulfuriques, et le titrage acidimétrique de la CMC acide.

EYLER, KLUG et DIEPHUIS ont utilisé : le dosage acidimétrique des carboxyles libérés de la CMC sodique par un acide minéral, et le dosage colorimétrique du reste glycolyl (29).

REESE et MANDELS (103) ont déterminé le DS par voie enzymatique. Le nombre d'unités de glucose non substitué est dosé par la glucose-oxydase, la CMC étant préalablement hydrolysée par un mélange de cellulase et de β-glucosidases.

Nous utilisons pour la détermination du DS :

- le dosage acidimétrique des carboxyles libérés par un acide minéral.

- le dosage colorimétrique employant l'acide chromotropique.

- la calcination et pesée des cendres sulfuriques.

Les 2 dernières méthodes ne peuvent s'appliquer qu'à des échantillons parfaitement purifiés.

I - Détermination du DS par le dosage acidimétrique des carboxyles.

Nous avons eu recours au protocole décrit par GREEN (40).

Une prise d'essai voisine de 1 g de CMC est triturée au mortier jusqu'à obtention de fibres bien séparées. Nous la transvasons dans une fiole conique avec 30 ml d'un réactif acide constitué par le mélange d'un volume de solution aqueuse d'acide chlorhydrique officinal à 70 p. 100 et 9 volumes de méthanol. Nous laissons en contact à la température du laboratoire avec agitation continue, pendant 12 heures.

Les fibres sont ensuite recueillies sur creuset filtrant et lavées avec du méthanol à 80° jusqu'à ce que les eaux de lavage soient neutres au rouge de méthyle. Il faut environ 250 ml de méthanol pour laver 1 g de produit.

Les fibres sont laissées en contact pendant une heure avec 30 ml de méthanol anhydre; après essorage et un dernier lavage avec du méthanol absolu, le produit est séché pendant 12 heures à 60° et 2 heures à 100°.

Une prise d'essai voisine de 0,700 g est alors pesée exactement et rapidement. Nous la délayons dans 100 ml d'eau et 40 ml de soude 0,1 N en agitant. Lorsque la dissolution est complète, l'excès d'alcali est titré par l'acide chlorhydrique 0,1 N en présence de phénolphtaléine.

Expression des résultats :

Le poids moléculaire moyen de la CMC sous sa forme acide est relié au DS par la formule :

$$PM = 162 + 58\ DS$$

162 = poids moléculaire d'une unité d'anhydroglucose

58 = correspondance à un poids moléculaire du radical CH - COOH.

Si nous désignons par A le nombre de milliéquivalents de soude nécessaires pour neutraliser 1 g de CMC sous sa forme acide, le DS est donné par :

$$DS = \frac{0,162\ A}{1-0,058\ A}$$

4 échantillons du produit A ont donné des DS respectifs de : 0,74 - 0,74 - 0,71 et 0,75.

Le produit B a donné un DS de 0,58

La Blanose R I955 a donné un DS de 0,62.

2 - Détermination du DS par colorimétrie :

EYLER, KLUG et DIEPHUS (29) ont utilisé, pour doser l'acide glycolique combiné à la CMC, la réaction décrite en 1932 par EEGRIVE, qui est une réaction de condensation des aldéhydes avec le dihydroxy 2-7 naphtalène.

Dans le passé, FLEURY et coll. ont eu recours à cette réaction pour déterminer l'acide glycolique formé par oxydation de cétoses à l'aide de l'acide periodique. Les résultats obtenus n'étaient pas très réguliers. Aussi avaient-ils préconisé l'emploi de l'acide chromotropique (acide dihydroxy 1-8 naphtalène disulfonique 3-6) (33).

L'acide glycolique chauffé en milieu sulfurique concentré avec une solution d'acide chromotropique donne une coloration violette dont le maximum d'absorption se situe à 580 nm. Cette réaction permet un dosage colorimétrique régulier et les composés chimiques susceptibles d'interférer sont peu nombreux (FLEURY, COURTOIS, PERLES et LE DIZET 33, 34, 35).

Nous avons observé que, par chauffage de 30 minutes au bain-marie bouillant, avec une solution sulfurique concentrée d'acide chromotropique, tout l'acide glycolique combiné à la CMC avait réagi. Le chauffage en milieu sulfurique concentré rompt les liaisons éther-oxyde entre la cellulose et l'acide glycolique, mais dégrade la cellulose pour donner de petites quantités de furfural. Tous les composés générateurs de furfural : les glucanes et plus particulièrement les pentosanes interfèrent. La coloration qu'ils donnent avec l'acide chromotropique est jaune orangé dont l'absorption maximale se situe à 370 nm, et l'absorption minimale à 580 nm.

La figure I donne 2 spectres d'absorption obtenus d'une part avec une solution 10^{-3}M d'acide glycolique et d'autre part avec une solution de même concentration de glucose. De 550 à 580 nm, la coloration obtenue avec le glucose présente la même absorption.

Il est donc possible d'éliminer l'interférence due aux dérivés furfuraliques en mesurant l'absorption de la coloration donnée par la CMC avec l'acide chromotropique à deux longueurs d'onde : 550 et 580 nm.

Protocole opératoire :

Dans des tubes à essai de 20 ml, nous introduisons

0,10 ml d'une solution de CMC à 0,200 g par litre

0,10 ml d'une solution aqueuse récente d'acide chromotropique à 5 p. 100

0,3 ml d'eau distillée

5 ml d'acide sulfurique pur. Les tubes sont maintenus dans un bain d'eau froide pendant l'affusion de l'acide sulfurique.

La courbe d'étalonnage est obtenue avec 0,10 - 0,20 - 0,30 et 0,40 ml d'une solution d'acide glycolique à 0,050 g par litre. Un témoin réactif est établi parallèlement au dosage.

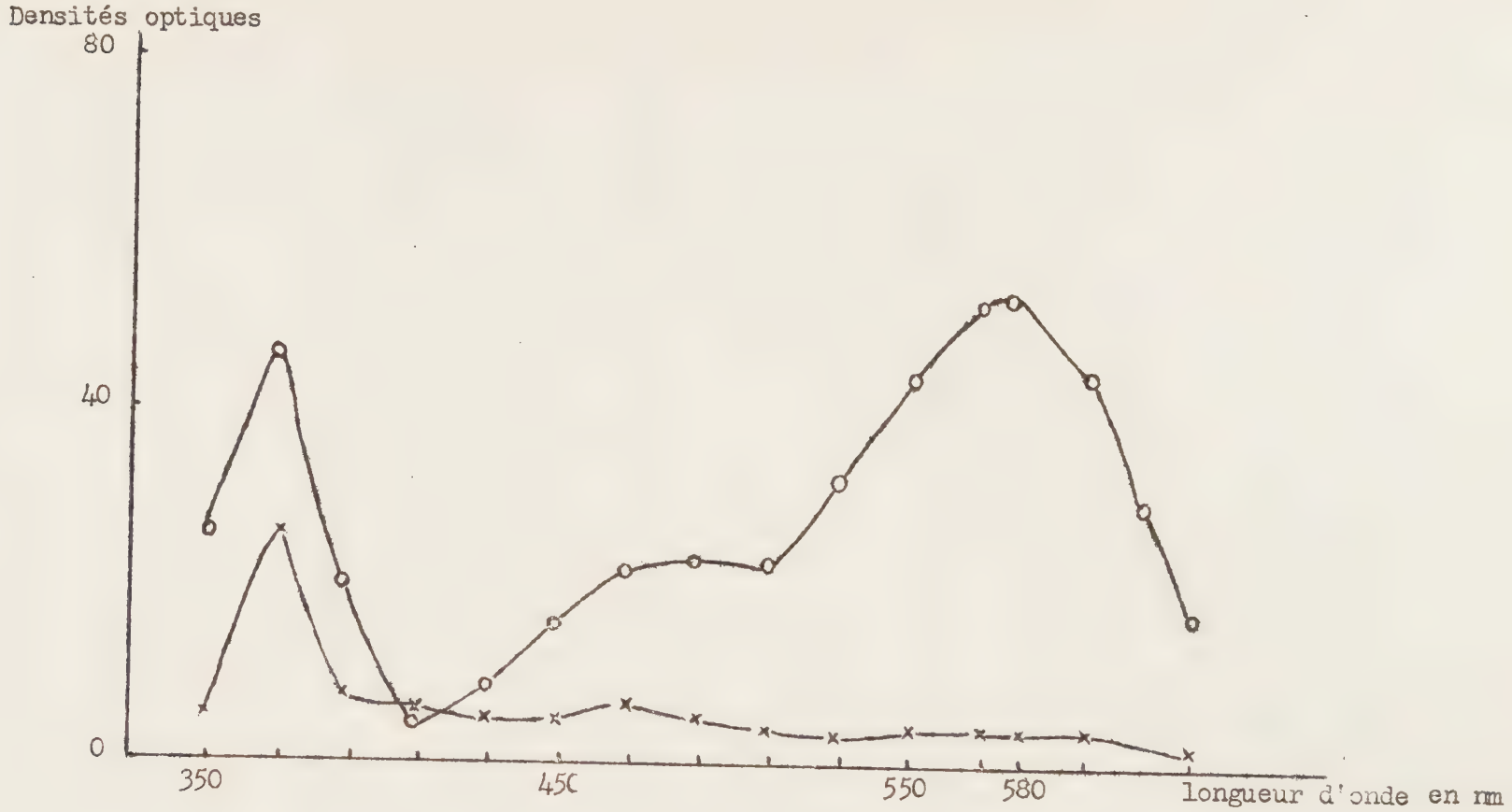


Figure 1 : Spectres d'absorption de la coloration obtenue par condensation avec l'acide chromotropique, d'une solution de glucose : 10^{-3}M et d'une solution d'acide glycolique : 10^{-3}M
o - acide glycolique ; x - glucose
en ordonnées : densités optiques
en abscisses : longueur d'onde en nm

Après agitation, les tubes sont plongés pendant 30 minutes dans un bain-marie bouillant. Nous laissons ensuite refroidir à la température du laboratoire et à l'obscurité pendant 45 minutes.

L'absorption de la coloration est lue contre le témoin réactif à 550 et 580 nm.

Avec différents échantillons de CMC, la coloration obtenue est directement proportionnelle à la quantité de CMC (figure 2).

Calcul :

A 550 nm, l'absorption D_o de la CMC est due à celle de l'acide glycolique combiné : D_I et à celle provenant de la chaîne de celluluse:D'

A 580 nm, l'absorption D'_o de la CMC est due à celle de l'acide glycolique : D_2 et à celle de la chaîne de cellullose qui est la même qu'à 550 nm : D'

La relation d'additivité des densités optiques nous permet d'écrire:

$$D_{o\,(550\ nm)} = D_I + D' \qquad (1)$$

$$D'_{o\,(580\ nm)} = D_2 + D' \qquad (2)$$

D'autre part, la concentration du corps à doser est reliée à la densité optique par :

$$D = \varepsilon . c . l$$

ε : coefficient d'extinction dépendant de la longueur d'onde

c : concentration du corps dans la solution à doser

l : épaisseur de la cuve

ε_1 et ε_2 de l'acide glycolique à 2 longueurs d'onde 550 et 580 nm sont obtenus à partir de la gamme étalon d'acide glycolique.

Les formules I et 2 deviennent :

$$D_o = \varepsilon_1 . c + D'$$

$$D'_o = \varepsilon_2 . c + D'$$

$$\text{d'où :} \quad c = \frac{D_o - D'_o}{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}$$

Calcul du DS : la formule de GREEN devient ici :

$$DS : \frac{0,162A}{1-0,08A}$$

A : Milliéquivalents d'acide glycolique par gramme de CMC sous sa forme sodique.

0,08 : 10^{-3}M. de $CH_2 - COONa$

Cette méthode de dosage donne, pour le produit B un DS de 0,59 et pour le produit A un DS de 0,75.

3 - Détermination du DS par pesée des cendres sulfuriques :

Le sodium de la CMC sodique est transformé en sulfate de sodium, par calcination en présence d'acide sulfurique.

Dans un creuset en silice préalablement porté au rouge et refroidi, nous pesons exactement un poids de 1 g de CMC. Nous ajoutons une quantité d'acide sulfurique concentré pour mouiller toutes les fibres. Nous évaporons l'acide sulfurique d'abord au bain-de-sable ensuite à feu nu. La calcination se poursuit jusqu'à disparition de particules noires dans le creuset et de vapeurs blanches d'anhydride sulfurique. Nous répétons l'opération jusqu'à obtention d'un poids constant de cendres.

Nous pouvons appliquer la formule établie au paragraphe précédent pour calculer le DS; Dans ces conditions, A représente 0,5 millimole de sulfate de sodium par gramme de CMC sodique.

Figure 2 - Condensation de différentes doses de CMC avec l'acide chromotropique.

o—— produit B ; x—— produit A
en ordonnées : µg d'acide glycolique
en abscisses : µg de CMC sodique

TABLEAU I

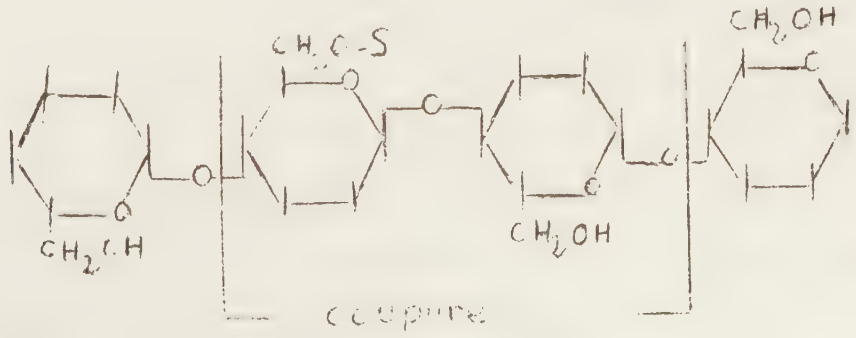
Valeurs des DS du produit B obtenues par 3 méthodes

Acidimétrie	Colorimétrie	Cendres sulfuriques
0,58	0,60	0,59
0,57	0,59	0,59

Les résultats obtenus avec les 3 méthodes sur un produit parfaitement purifié sont concordants.

B - Détermination des groupements α-glycols libres par oxydation périodique :

KLOP et KOOIMAN (66) ont séparé par chromatographie, les oses provenant de l'attaque des CMC et d'HEC de DS différents par les cellulases de Myrothecium verrucaria et de Luizyme. Ils ont décelé, à côté du glucose, la présence d'un disaccharide : le glucosido-glucose substitué en 6, et en déduisent que seules les liaisons osidiques reliant soit 2 unités de glucose non substitué, soit un glucose non substitué et un glucose substitué en 6 sont coupées par les cellulases.



Selon ces auteurs, la spécificité des cellulases est comparable à celle des β-glucosidases : la modification apportée sur le Carbone 6 ne change pas le comportement de l'enzyme, alors que celle apportée sur le Carbone 2 ou 3 empêche l'action des enzymes.

Afin d'étudier l'influence du DS sur la proportion de groupements α-glycols libres, nous avons réalisé nos essais sur 2 CMC de DS 0,58 et DS 0,74.

La figure 3 montre qu'à la température de la glacière, l'oxydation progresse régulièrement et se stabilise après 6 jours environ. Une durée de contact plus prolongée n'augmente pas la quantité d'oxydant consommé. Les réactions de superoxydation à partir de l'extrémité réductrice des chaînes de cellulose sont donc assez limitées. Ceci tend à indiquer que le DP des CMC reste encore important. En effet, avec de courtes chaînes d'hexoses liées en 1→4, la superoxydation se manifeste de façon très nette après 5 à 6 jours de contact avec l'acide periodique. C'est par exemple le cas des glucomannanes d'Orchidées (DALOUL, PETEK et COURTOIS 24), un polysaccharide formé d'unités β-mannopyranosyl et β-glucopyranosyl dans le rapport de 3 à 1, ces hexoses étant reliés par des liaisons 1→4.

La courbe 4 montre que l'oxydation periodique est régulière : les quantités d'acide periodique réduit sont proportionnelles aux quantités de CMC oxydée .

Résultats :

Les quantités d'acide periodique réduit par unité d'anhydroglucose diminuent lorsque le DS augmente.

Il y a consommation de 0,85 mole environ d'acide periodique pour la CMC de DS 0,58 et 0,65 mole d'acide periodique pour la CMC de DS 0,74.

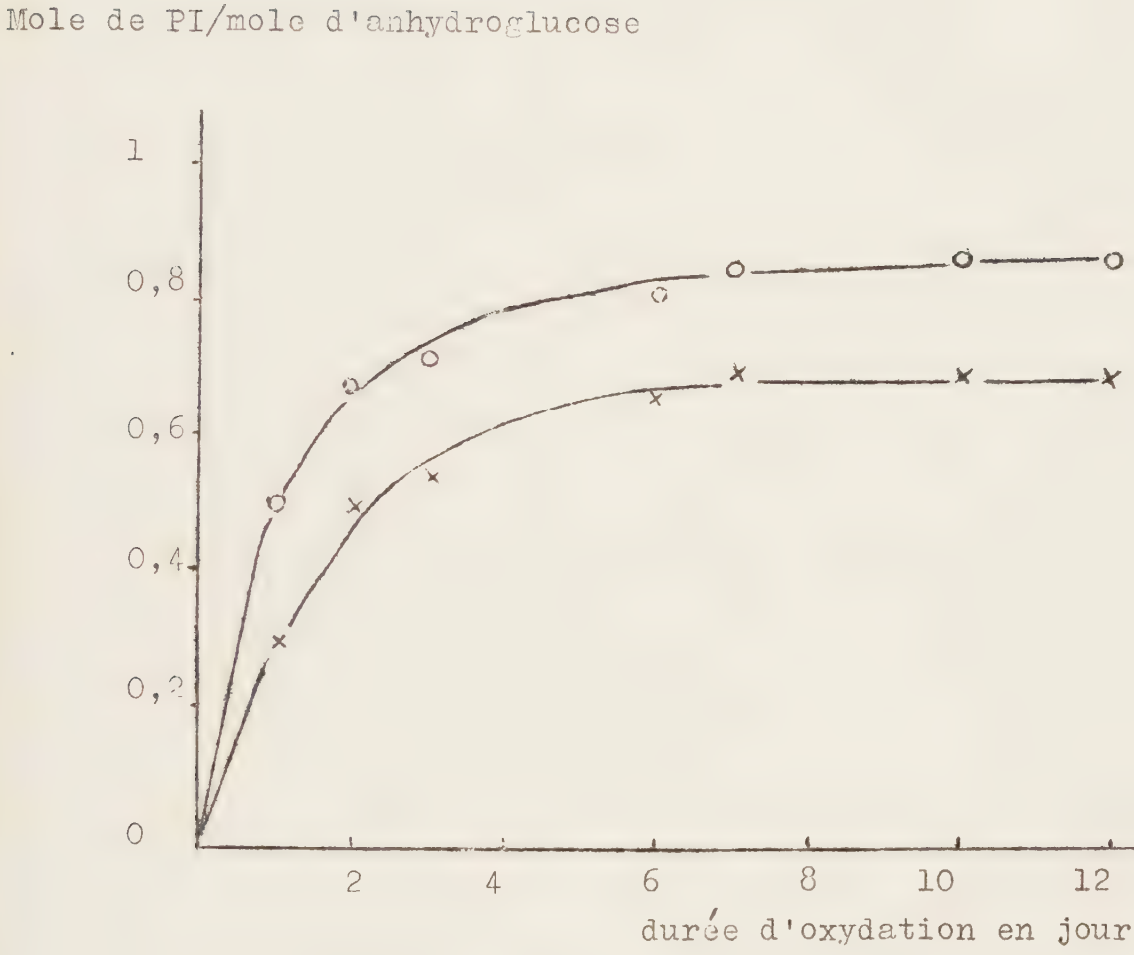


Figure 3 - Oxydation periodique de 2 CMC en fonction de la durée d'oxydation

o— CMC de DS 0,58
x— CMC de DS 0,74

en ordonnées : mole de PI/mole d'anhydroglucose

en abscisses : durée d'oxydation en jours

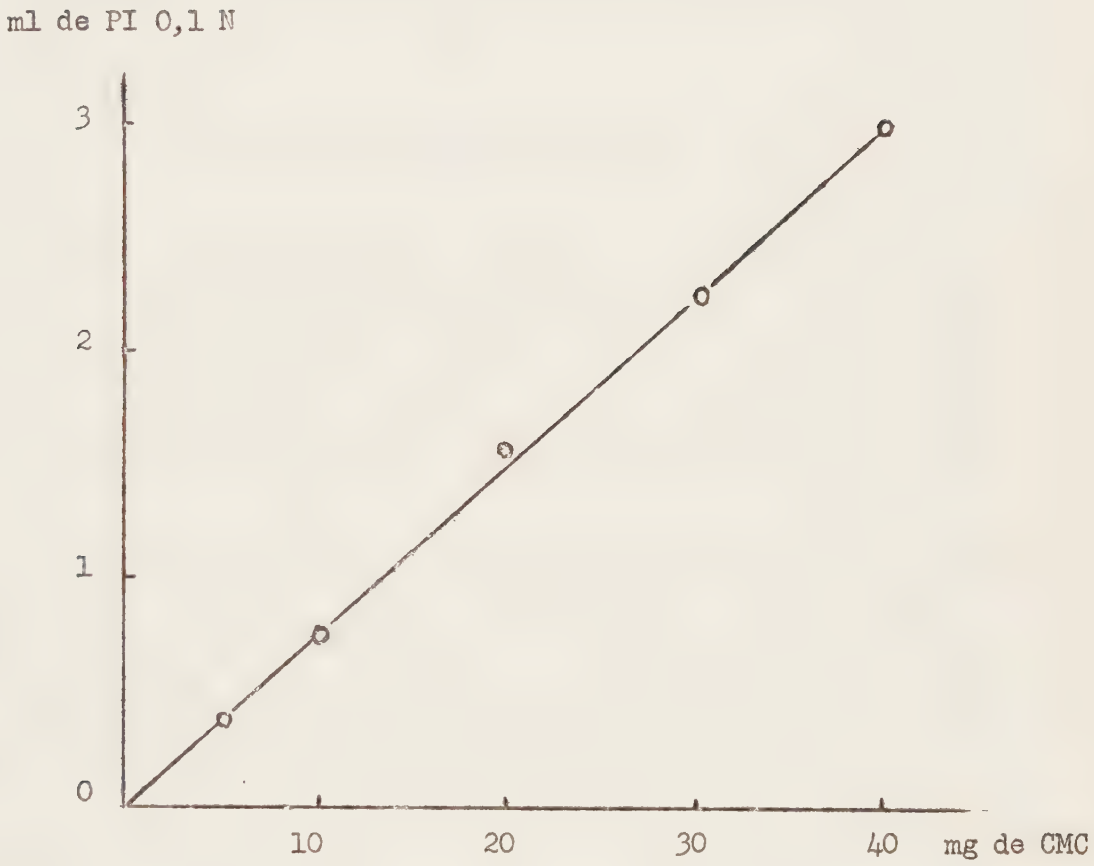


Figure 4 - Oxydation periodique de la CMC de DS 0,62 en fonction des quantités de CMC à oxyder.

Durée de réaction : 11 jours.

en ordonnées : ml PI 0,I N
en abscisses : mg de CMC

Donc, la substitution ne se fait pas uniquement sur le carbone 6. La comparaison des teneurs en groupements α-glycols libres des 2 CMC suggère qu'au début de la réaction, la substitution porte en général sur le carbone 6, et qu'au fur et à mesure que la réaction progresse, les hydroxyles secondaires sont substitués préférentiellement aux hydroxyles primaires.

C - Oxydation nitrochromique :

Les figures 5 et 6 montrent que l'oxydation nitrochromique se stabilise après 7 jours à la température ordinaire, et 5 heures à la température du bain-marie bouillant. La lenteur de la réaction à 20° ne nous permettant pas de l'adopter pour un dosage, nous avons été amené à opérer à chaud.

Le tableau II montre qu'avec 2 échantillons de DS distinct, il y a proportionnalité entre les quantités de CMC et les quantités d'oxydant.

Les quantités théoriques d'oxydant sont calculées sur la base des 2 équations suivantes donnant une oxydation complète de la molécule en CO_2

$$C_6H_{10}O_5 + 12\ I/2\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 5\ H_2O$$

$$C_6H_9O_5\text{-}CH_2\text{-}COOH + 15\ I/2\ O_2 \longrightarrow 8\ CO_2 + 6\ H_2O$$

Les quantités d'oxydant réellement utilisées atteignent 80 à 85 p. 100 de la quantité calculée selon les 2 formules. L'oxydation n'est pas totale.

Nous avons recherché la présence d'acide acétique qui pourrait se former par oxydation partielle du groupement substitué :

0,400 g de CMC sont oxydés pendant 5 heures au bain-marie bouillant par 320 ml de solution nitrochromique 0,1N. La solution refroidie est

TABLEAU II

Oxydation nitrochromique de 2 CMC de DS 0,58 et 0,74 à la température d
bain-marie bouillant pendant 5 heures

mg de CMC sodique	DS des CMC			
	0,58		0,74	
	quantités calculées	quantités trouvées	quantités calculées	quantités trouvées
2	2,63	2,30	2,57	2,20
4	5,26	4,60	5,14	4,60
6	7,89	6,95	7,71	6,75

Les chiffres du tableau correspondent au nombre de ml de solution d'oxydant 0,1N consommé

maintenue dans la glace fondante; nous neutralisons l'acide nitrique par la soude en pastilles et acidifions ensuite légèrement par un acide fixe l'acide phosphorique. —→ solution A.

Nous procédons à un entraînement à la vapeur d'eau et recueillons le distillat dans la soude diluée. Le distillat est ensuite concentré et la recherche d'acide acétique est faite par uneméthode colorimétrique employant le nitrate de lanthane et l'iode (HUTCHENS 53).

La recherche d'acide acétique a toujours été négative.

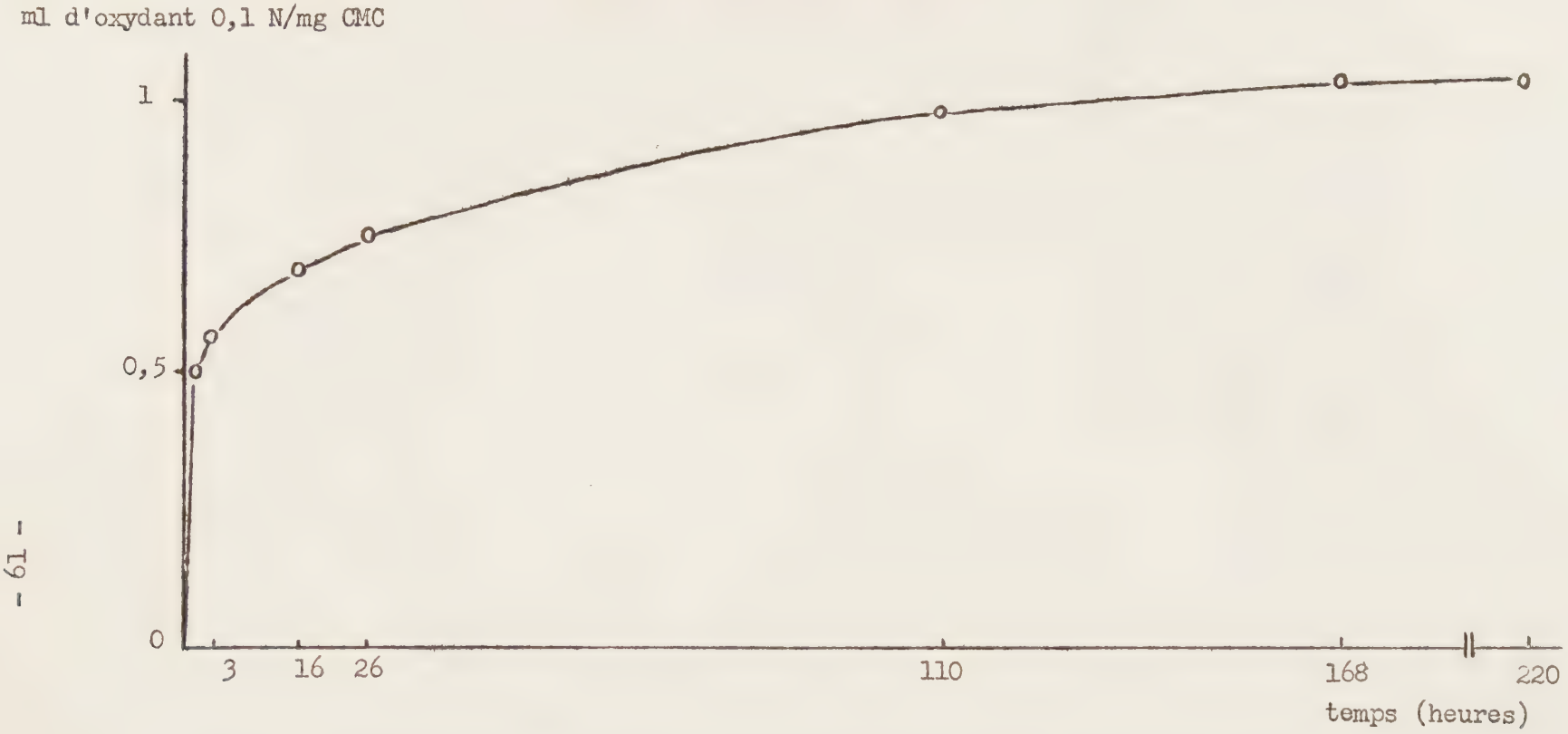


Figure 5 - Oxydation nitrochromique de la CMC de DS 0,62 à la température ordinaire.

en ordonnées : ml de solution d'oxydant 0,I N par mg CMC
en abscisses : durée de la réaction en heures

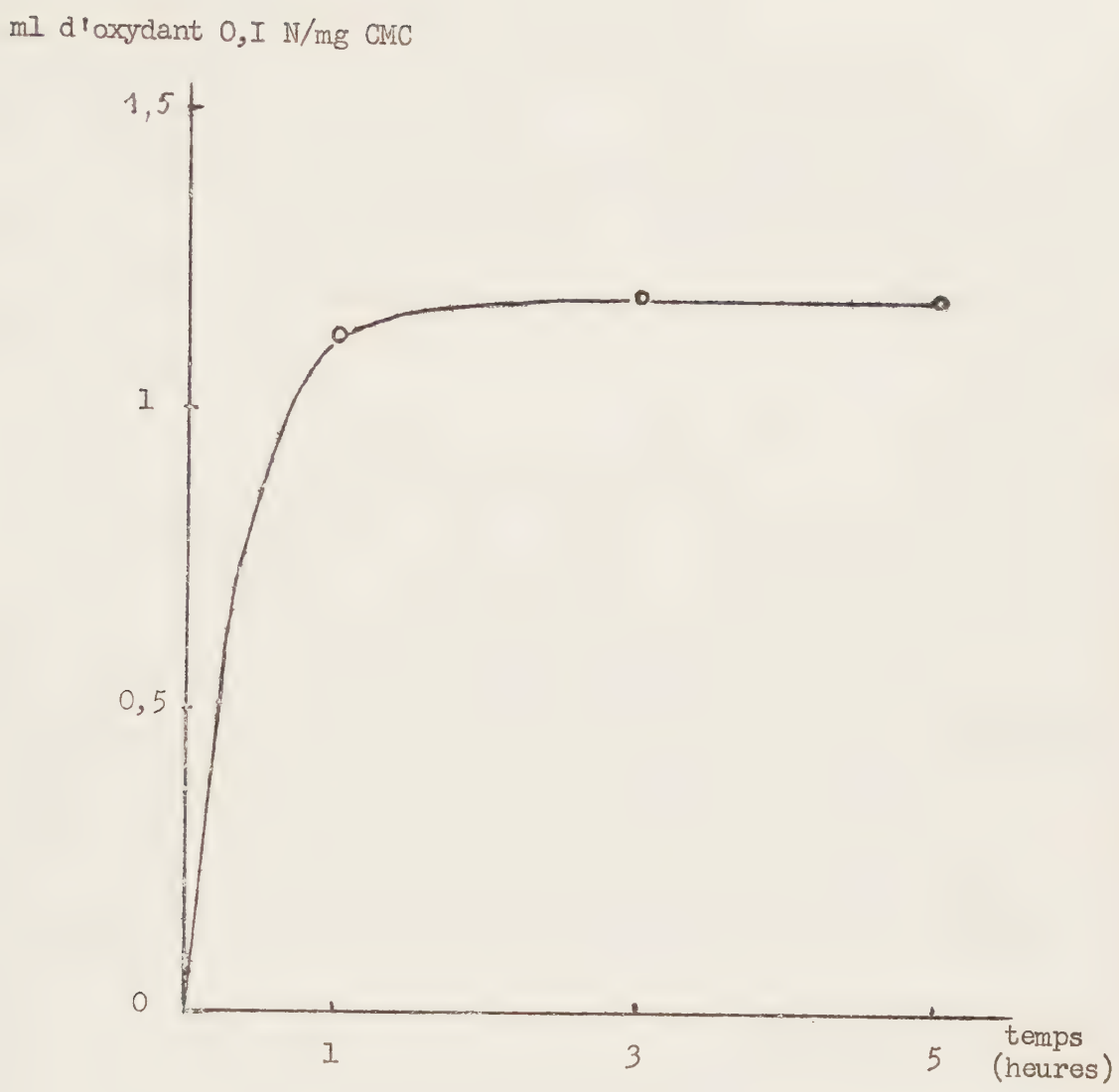


Figure 6 - Oxydation nitrochromique de la CMC de DS 0,58 au bain-marie bouillant.

en ordonnées : ml de solution d'oxydant 0,I N par mg de CMC
en abscisses : durée de la réaction (en heures)

Nous avons par ailleurs constitué un milieu synthétique en ajoutant à la solution A 0,1 ml d'une solution 0,1 N d'acide acétique. Après entraînement à la vapeur, en utilisant la réaction colorimétrique de HUTCHENS, nous avons retrouvé la totalité de l'acide acétique ajouté.

Il est probable que l'oxydation de la CMC produise de petites quantités de CO qui échappent à une oxydation ultérieure en CO_2 et qui expliquent le déficit d'oxydant observé en pratique par rapport à la quantité théorique.

D - Hydrolyse acide de la CMC :

Nous n'avons pas utilisé l'hydrolyse acide de la CMC et le dosage des sucres réducteurs libérés pour doser la CMC. En effet, l'hydrolyse acide de la CMC a donné des résultats beaucoup trop faibles par rapport à ceux calculés à partir du poids moléculaire moyen. Les valeurs obtenues représentent environ 65 p. 100 des valeurs théoriques.

Il est connu que la substitution des hydroxyles de la cellulose par un groupement carboxyle rend la cellulose plus résistante à l'hydrolyse acide.

C'est ce qui explique la faible vitesse d'hydrolyse de la cellulose du bois par rapport à celle du coton. (JORGENSEN 61, RÄNBY et MARCHESSAULT 100). Lorsque l'on réduit les groupements carboxyle et carbonyle de la cellulose du bois par le borohydrure, on hydrolyse la cellulose du bois aussi complètement que celle du coton.

D'ailleurs en règle générale l'introduction d'un carboxyle sur un corps osidifiant un ose stabilise cette liaison osidique. Dans les polysaccharides contenant des acides uroniques intercalés avec des oses ou dérivés l'on obtient ainsi par hydrolyse acide partielle des uronosyl -

oses ou osamines.

E - Viscosité des solutions aqueuses de CMC:

La détermination de la viscosité de la CMC est assez délicate. En effet, la CMC sodique est pseudo-plastique et thixotrope : sa viscosité augmente au repos et dépend du gradient de vitesse lors des mesures.

Avec le viscosimètre à rotation Rotovisko, la viscosité est fonction de la vitesse de rotation : elle diminue lorsque la vitesse augmente.

Il est donc indispensable de prendre un certain nombre de précautions :

- bien agiter la solution avant chaque mesure pour remettre la CMC en solution.

- employer la même durée de rotation pour chaque détermination : 15 secondes.

- laisser la solution au repos, entre chaque essai, pour lui permettre de reprendre sa viscosité initiale. Le temps nécessaire est d'environ 15 minutes.

- extrapoler à gradient de vitesse nul les mesures effectuées à différentes vitesses pour avoir la valeur de la viscosité apparente. Un grand nombre de déterminations employant les vitesses dont dispose l'appareil,sont nécessaires.

Une solution à 1 p. 100 dans l'eau des 2 échantillons de DS 0,74 donne à 25° une viscosité apparente de : 330 et 315 cP.

La Pharmacopée française admet l'emploi de différentes sortes de CMC dont la viscosité mesurée sur une solution aqueuse à 1 p. 100 varie de 300 à 2.200 cP.

-o-o-o-

C H A P I T R E II

PREPARATION - ESSAIS ANALYTIQUES DE L'HEC

-o-o-o-

I) - PREPARATION DE L'HEC :

L'HEC est obtenue par condensation de la cellulose en milieu alcalin (soude ou potasse) avec l'oxyde d'éthylène.

$$Cell\,(OH) + CH_2\!-\!O\!-\!CH_2 \xrightarrow{NaOH} Cell\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2OH$$

Les hydroxyles en positions 2, 3 et 6 des molécules d'anhydroglucose sont susceptibles de réagir. La réactivité relative de ces 3 hydroxyles diffère selon les auteurs.

Selon JONES (60), elle serait de 3 : I : I0

Selon SPURLIN (122), elle serait de I : I : I

La réaction d'éthérification se complique du fait que les fonctions hydroxyles des groupements O-hydroxyéthyl sont 2 fois plus réactionnelles avec l'oxyde d'éthylène (6C) que les fonctions hydroxyles de la molécule de cellulose. Il en résulte la fixation de nouvelles molécules de glycol sur le substituant dont la chaîne s'allonge.

$$Cell\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2OH + n\ CH_2\!-\!O\!-\!CH_2 \xrightarrow{NaOH} Cell\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}(O\text{-}CH_2\text{-}CH_2)^{n-I}\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2OH$$

De plus, les molécules d'oxyde d'éthylène, en milieu alcalin,

réagissent entr'elles pour former des polyoxyéthylèneglycols.

On désigne par DS, le nombre de substituants par unité d'anhydroglucose, et par MS, le nombre total de molécules d'oxyde d'éthylène par unité d'anhydroglucose. La valeur maximale du DS est 3, et celle du MS est toujours supérieure à 3. Les produits solubles dans l'eau sont ceux ayant un MS supérieur à 1,50.

L'HEC est préparée pratiquement avec l'oxyde d'éthylène gazeux sous pression. Nous avons, pour des raisons de commodité de travail au laboratoire, effectué la réaction à la pression atmosphérique en utilisant une solution d'oxyde d'éthylène dans un solvant inerte : l'isopropanol. Dans ces conditions, le coton réagit très difficilement.

Malgré de multiples essais, en faisant varier les conditions opératoires, nous n'avons pu avoir de résultats réguliers. La solubilité du produit ainsi obtenu demeurait toujours incomplète.

Comme matière première, nous avons eu recours à la poudre de cellulose Whatman pure (Référence CF II pour colonne chromedia). D'après des informations orales, cette cellulose aurait pour origine les linters de coton.(1)

L'hydrolyse acide de cette poudre de cellulose n'a permis de déceler par chromatographie que le seul glucose.

Technique opératoire :

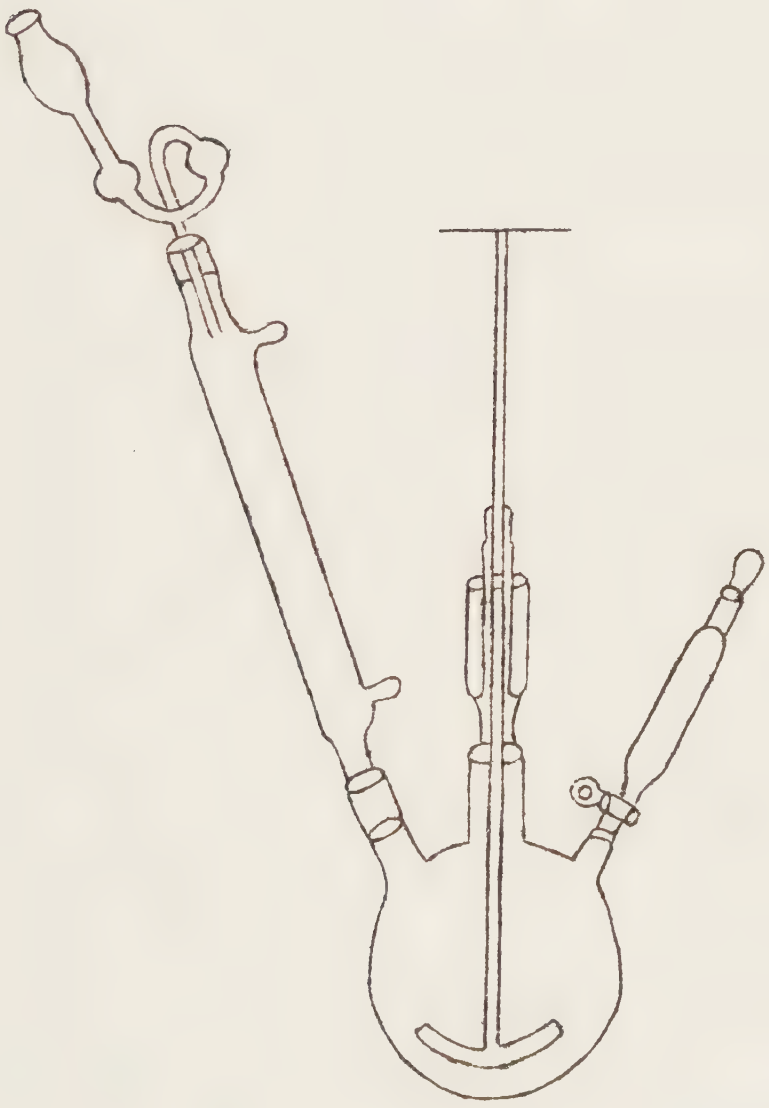
Dans un ballon à 3 tubulures, nous introduisons :

25 g de poudre de cellulose

---

(1) Les linters sont de très courtes fibres qui sont laissées sur les graines de coton après un premier égrenage. Ils sont ensuite séparés des graines au cours d'un deuxième égrenage.

Schéma de montage



350 ml d'isopropanol

50 ml d'une solution de soude à 30 p. 100

Après agitation vigoureuse, nous laissons le mélange en contact pendant 15 minutes dans une enceinte où l'on a fait le vide, pour éviter l'action dégradante de l'oxygène de l'air sur le polysaccharide en milieu alcalin.

Nous adaptons sur la tubulure centrale un agitateur mécanique à joints rodés, sur une tubulure latérale, un réfrigérant surmonté d'une garde à mercure, sur la dernière tubulure une ampoule à réactif fermée par un bouchon rodé.

Une solution de 8 ml d'oxyde d'éthylène dans 20 ml d'isopropanol préalablement refroidie à -10° est introduite par l'ampoule à réactif, l'agitation dure 2 heures à 15-20°.

Une deuxième portion contenant 20 ml d'oxyde d'éthylène dans 20 ml d'isopropanol est ajoutée au mélange et le ballon est placé sur le bain-marie réglé à 70°. L'agitation continue encore pendant 90 minutes.

La poudre fortement colorée que l'on obtient est essorée sur Büchner, puis mise en suspension dans 300 ml d'éthanol à 95°. L'alcali est neutralisé par l'acide acétique en présence de phénolphtaléine. Le lavage se fait sur Büchner avec environ 300 ml d'éthanol à chaque lavage. Il faut utiliser environ 2 litres d'éthanol.

La poudre est remise en suspension dans 200 ml d'acétone, et lavée 3 fois de suite avec 200 ml d'acétone.

La matière colorante et les polyéthylène-glycols qui peuvent se former pendant la préparation sont éliminés. On obtient finalement une poudre blanche qui est séchée sous vide phosphorique à la température ordinaire pendant 3 jours.

25 g de cellulose donnent environ 20 g d'HEC.

II) - ESSAIS ANALYTIQUES DE L'HEC :

Diverses méthodes ont été proposées (KLUG 67) pour déterminer la structure de l'hydroxyéthylcellulose : l'acétylation pyridinée conduisant par la substitution des hydroxyles de l'HEC, à un dérivé triacétylé - la détermination des groupes hydroxyéthyl par la méthode de ZEISEL modifiée - la phtalation pyridinée conduisant à la substitution des hydroxyles primaires des chaînes polyoxyéthyléniques de l'HEC.

COHEN et HAAS (12) ont constaté que l'acétylation en milieu pyridiné était lente et incomplète pour des HEC moyennement substituées.

La méthode de ZEISEL modifiée (donnant comme l'acétylation pyridinée le DS de l'HEC) demande un appareillage fort complexe (JULLANDER et LAGERSTRÖM 62).

La fixation de l'anhydride phtalique sur la fonction alcool primaire du substituant nous indique la longueur des chaînes latérales.

Pour l'action des cellulases, comme nous l'avons indiqué dans les essais analytiques de la CMC, l'emplacement des substituants est plus important que leur longueur de chaîne. C'est pourquoi, nous avons employé l'oxydation periodique pour connaître la proportion de groupements α-glycols libres, et le dosage des molécules de glucose libre et de glucose substitué libérées par une hydrolyse acide qui nous renseigne sur le DS de la molécule. Nous avons complété ces essais par l'oxydation nitrochromique.

A - Hydrolyse acide de l'HEC:

L'hydrolyse acide intégrale de la cellulose est difficile à réaliser. SAELAN et coll. (112) estiment que dans les meilleures conditions,

l'hydrolyse acide ne fournit pas plus de 95 p. 100 de la quantité théorique de glucose. L'HEC est hydrolysée plus facilement que la CMC. Les liaisons osidiques entre les unités de glucose non substituées et les unités de glucose substituées étant rompues à la même vitesse (23) par un acide, le rapport glucose libre / glucose substitué est le même dans l'hydrolysat acide que dans la chaîne d'HEC.

Nous avons adopté le schéma en 2 étapes préconisé par SAEMAN et coll. (112) : hydrolyse primaire en oligosaccharides par l'acide concentré à froid, hydrolyse secondaire de ces oligosaccharides en milieu acide plus dilué à chaud.

Technique :

0,150 g d'HEC préalablement desséchée à 100° ou son poids équivalent en produit hydraté, sont immergés dans 1 ml d'acide sulfurique à 72 p. 100 en volume, et maintenus à 4° pendant 16 heures. L'HEC est totalement solubilisée. Après dilution avec 25 ml d'eau distillée, la solution est répartie en ampoules qui sont scellées, puis plongées dans un bain-marie bouillant.

Après des durées d'hydrolyse variables, la totalité des saccharides réducteurs est déterminée par la technique de JANSEN et MAC DONNELL (56), utilisant l'iode en milieu alcalin. Le glucose est déterminé par la glucose-oxydase.

a/ Dosage des saccharides réducteurs par l'iode en milieu alcalin :

L'hydrolysat est neutralisé par la soude N et dilué au 1/3 pour le dosage des saccharides totaux : à une prise d'essai de 5 ml de la dilution contenue dans un erlenmeyer bouché émeri, nous ajoutons 3 ml d'une solution

de CO_3Na_2 à 10 p. 100 et 5 ml exactement mesurés d'une solution d'iode 0,1N. Un essai à blanc est constitué en remplaçant la prise d'essai par le même volume d'eau distillée.

Une courbe d'étalonnage est obtenue en oxydant par l'iode dans les mêmes conditions : 2 ml, 3 ml, 4 ml et 5 ml d'une solution de glucose à 2 p. 1000.

Après 20 minutes de contact à l'obscurité, les solutions sont acidifiées avec 5 ml d'acide sulfurique 4N. L'excès d'iode est titré par le thiosulfate 0,1N.

b/ Dosage du glucose par la glucose-oxydase:

L'hydrolysat acide neutralisé par la soude est dilué au 1/10°. Le dosage du glucose est effectué avec une prise d'essai de 0,4 ml de la dilution.

Résultats :

Après 4 heures d'hydrolyse, 1 mg d'HEC donne : 0,68 mg de saccharides réducteurs totaux.

Après 8 heures, ce taux s'élève à : 0,77 mg et après 12 heures, la destruction partielle de glucose ne laisse plus que : 0,62 mg

2 échantillons d'HEC préparés selon la technique décrite plus haut ont donné par mg d'HEC : 0,74 et 0,77 mg de saccharides réducteurs totaux dont : 0,263 et 0,27 mg de glucose non substitué dosé par la glucose-oxydase.

Le rapport glucose non substitué sur saccharides réducteurs totaux représente : 0,355 et 0,360 pour les 2 échantillons.

Le poids moléculaire moyen de l'HEC est donné par :

$$PM = \frac{180}{x}$$

x : représente le poids de saccharides réducteurs totaux libérés par 1 g d'HEC.

Le PM moyen de nos échantillons est : 240 ± 5

Le MS de l'HEC peut être calculé à partir de :

$$PM = 162 + 44\ MS$$

44 : PM de $CH_2\overset{O}{\diagdown\diagup}CH_2$

d'où $$MS = \frac{PM - 162}{44}$$

Le MS de nos échantillons est de 1,7 ± 0,1

-o-o-o-o-o-

c/ Chromatographie des sucres libérés par l'hydrolyse acide :

L'hydrolysat acide pendant 8 heures est neutralisé par du carbonate de baryum puis concentré au 1/10°.

Il est soumis à une chromatographie descendante sur papier Whatman 1 avec le solvant :

Méthyléthylcétone : 6,5

n Butanol : 3

Acétate d'éthyle : 2

Eau : 6 en volumes

La révélation est faite avec le réactif de PARTRIDGE (91) au phtalate d'aniline.

Après 2 jours de développement, nous observons la présence de glucose et de 5 corps, dont les mobilités chromatographiques par rapport au

glucose sont respectivement de

1,3 - 1,6 - 1,9 - 2,1 - et 2,4

Ceci montre la complexité de la constitution de l'HEC.

B - Oxydation periodique :

La figure 7 montre qu'à la température de la glacière, l'oxydation évolue lentement.

Après 8 jours de contact, se manifeste le phénomène de superoxydation; il apparait de l'acide formique dans le milieu. En extrapolant la 2ème partie de la courbe et en prenant son point d'intersection avec la tangente à l'origine de la première partie de la courbe, nous obtenons environ 0,5 mole de PI par mole d'anhydroglucose.

2 échantillons obtenus selon le protocole décrit, au cours de préparations distinctes, ont consommé la même quantité de PI. La figure 8 confirme que la réaction d'oxydation est régulière.

L'hydrolyse acide de l'HEC a donné 65 p. 100 d'unités d'anhydroglucose substitué et l'oxydation periodique indique que 50 p. 100 des unités de glucose sont substituées en 2 ou 3. Il est donc probable que la substitution porte sur les 3 carbones selon les vitesses relatives indiquées par SPURLIN (122).

C - Oxydation nitrochromique :

L'oxydation nitrochromique de l'HEC se stabilise après 6 heures au bain-marie bouillant. (Figure 9).

Le tableau III indique que l'HEC est mieux oxydée que la CMC. La quantité d'oxydant obtenue représente environ 94 p. 100 de la quantité théorique, calculée sur la base d'une oxydation totale de la molécule en

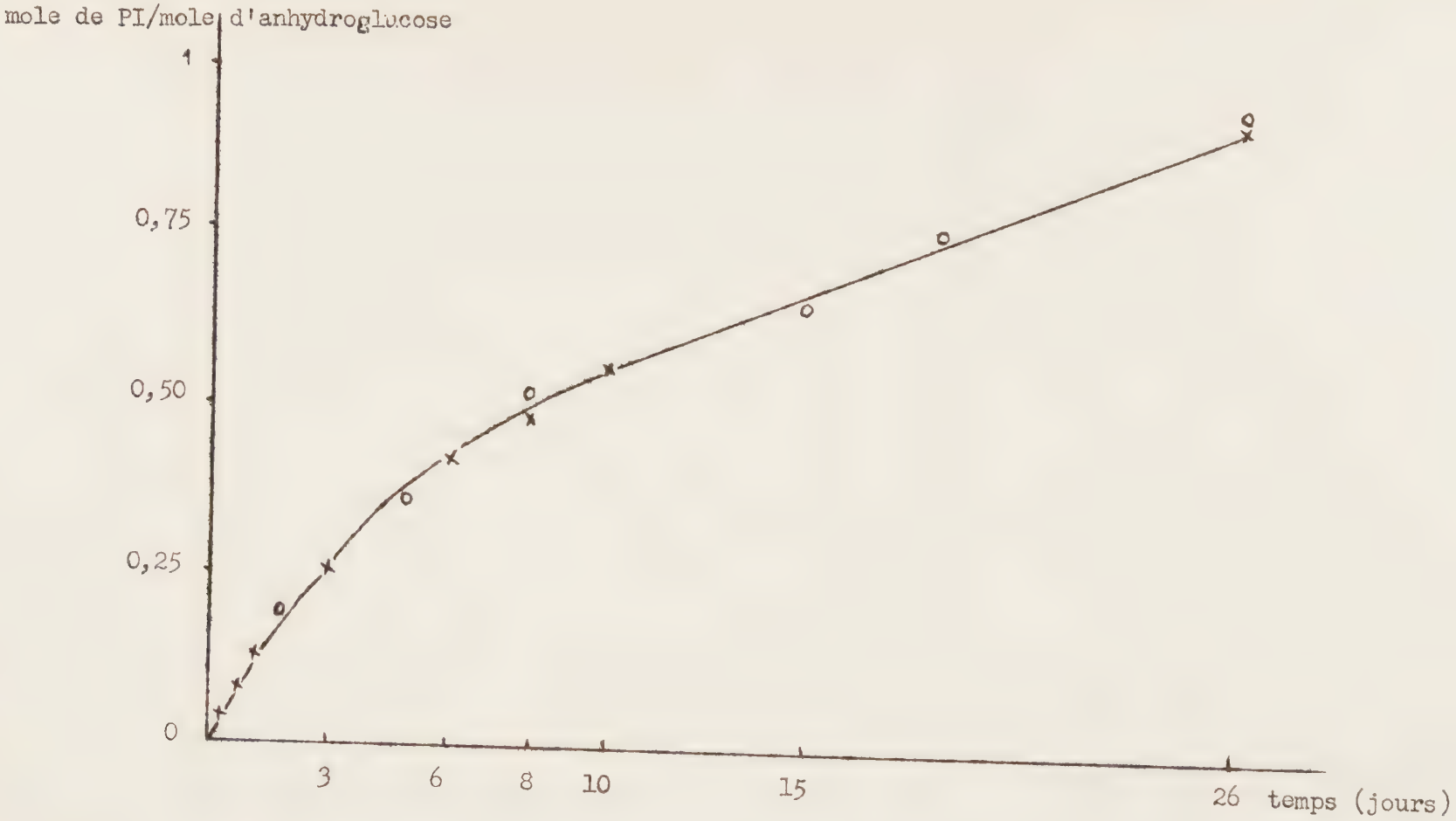


Figure 7 - Courbe d'oxydation periodique d'HEC en fonction de la durée d'oxydation

o—o : 1er échantillon
x—x : 2° échantillon
en ordonnées : mole PI/mole d'anhydroglucose
en abscisses : durée d'oxydation (jours)

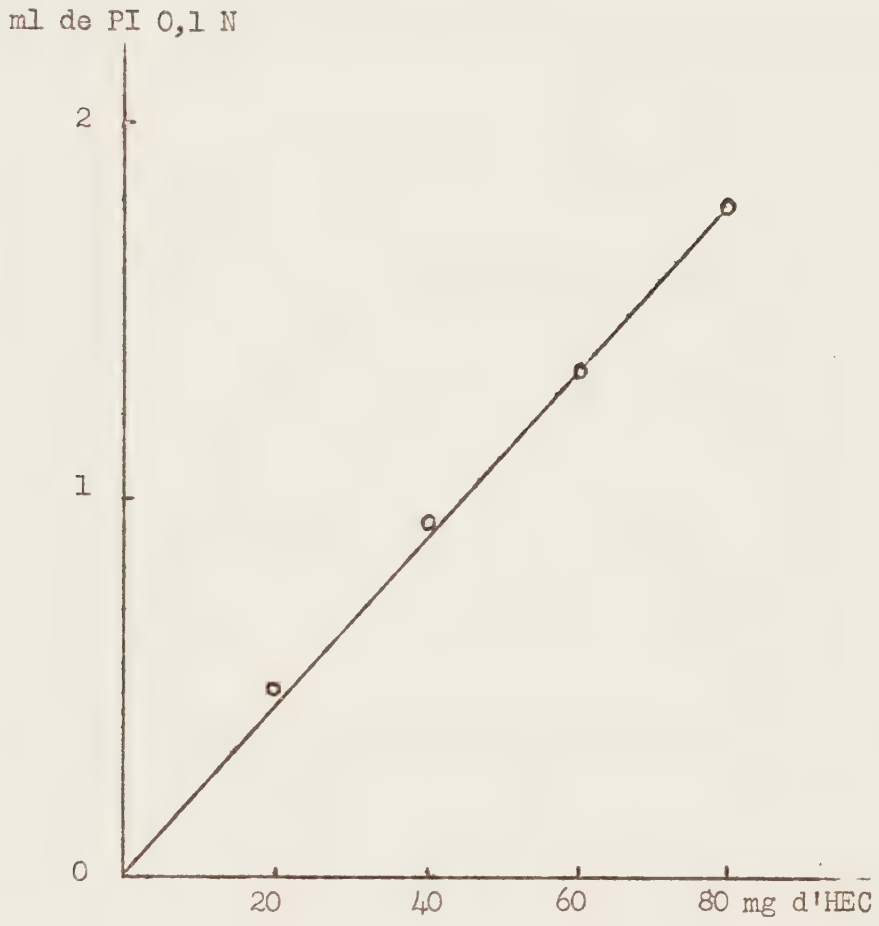


Figure 8 - Oxydation periodique en fonction de la quantité d'HEC, après 3 jours de contact.

en ordonnées : ml de PI 0,1 N
en abscisses : mg d'HEC

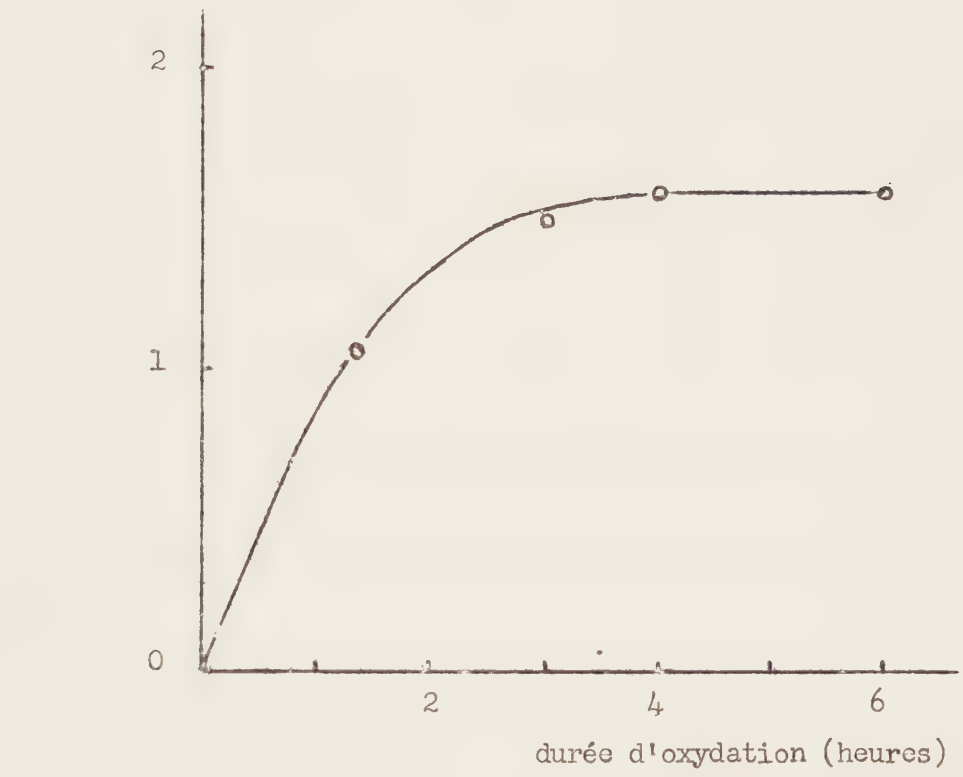


Figure 9 - Oxydation nitrochromique de l'HEC au bain-marie bouillant en fonction du temps.

en ordonnées : ml d'oxydant 0,1 N nécessaires pour oxyder 1 mg d'HEC
en abscisses : durée de l'oxydation en heures.

CO_2, le poids moléculaire moyen de l'HEC est obtenu à partir des données fournies par l'hydrolyse acide.

TABLEAU III

Oxydation nitrochromique de l'HEC au bain-marie bouillant pendant 6 heures

ml d'oxydant 0,1 N	mg d'HEC 1,5	3	4,50
trouvés	,34	4,70	7
théoriques	2,50	5,0	7,50

D - Viscosité des solutions aqueuses :

Les mesures de viscosité sont faites sur une solution aqueuse à 2 p. 100.

La viscosité spécifique, déterminée à 25° est de :

7 - 7,05 - 7,10 pour les 3 échantillons d'HEC.

Le vieillissement des solutions de dérivés cellulosiques s'accompagne généralement d'une diminution de leur viscosité : cette diminution est faible avec l'HEC. Une solution à 1 p. 100 d'HEC perd 5 p. 100 de sa viscosité après un séjour d'un mois à la glacière. Il y a alors une stabilisation, car après deux mois la viscosité demeurait la même qu'après le premier mois.

-o-o-o-

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS DES ESSAIS DE PREPARATION ET DE CONTROLE DES SUBSTRATS

-o-o-o-

Parmi les macromolécules, il est souvent difficile de reproduire avec régularité les mêmes dérivés.

Les méthodes analytiques utilisées pour les essais de la CMC et de l'HEC ont permis de constater qu'il était possible de préparer au laboratoire en suivant scrupuleusement un protocole établi, des dérivés de la cellulose ayant un DS déterminé.

1° - La viscosité d'un dérivé soluble de la cellulose dépend : du DP de la cellulose et du DS du dérivé. Donc, pour des dérivés préparés à partir de la même matière première la viscosité dépend du DS. C'est un moyen simple et rapide de contrôler 2 échantillons différents.

2° - La détermination du DS du sel sodique de la CMC peut-être effectuée par l'une des 3 méthodes : acidimétrie, dosage colorimétrique de l'acide glycolique ou cendres sulfuriques. L'association des 3 méthodes permet de contrôler la pureté du produit. En effet, la colorimétrie et la détermination des cendres sulfuriques ne s'appliquent qu'à des produits parfaitement purifiés.

3° - La mesure de la viscosité d'une part, les essais chimiques d'autre part : hydrolyse acide, oxydation periodique, oxydation nitrochromique, montrent que les 3 échantillons d'HEC obtenus selon notre protocole opératoire sont pratiquement identiques.

La détermination du rapport glucose non substitué par unité

d'anhydroglucose après une hydrolyse acide nous renseigne sur la sensibilité de la molécule d'HEC à l'attaque enzymatique.

L'oxydation par l'acide periodique permet de son côté de déterminer la proportion d'unités de glucose qui ne sont pas substituées soit sur la fonction alcoolique en 2, soit sur celle en 3.

L'oxydation nitrochromique est régulière et représente un indice global caractéristique du dérivé.

-o-o-o-

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CMC ET DE L'HEC

-o-o-o-

A) - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CMC :

Nous avons utilisé pour notre expérimentation des préparations commerciales de cellulases utilisées en pharmacie, que nous désignerons par un numéro en chiffres romains. Les préparations I à IV ont servi aux essais de la CMC et les préparations V à VII ont servi aux essais ultérieurs de l'HEC.

- L'activité de ces préparations en fonction du DS du substrat a été étudiée sur les 2 CMC de DS 0,58 et 0,74.

- L'activité en fonction du pH, en fonction des concentrations du substrat et en fonction de la durée d'hydrolyse a été déterminée sur la CMC de DS 0,58.

Le degré d'hydrolyse a été suivi par le dosage des sucres réducteurs totaux exprimés en glucose (méthode de SOMOGYI-NELSON) et celui du glucose (par la glucose-oxydase).

1° - Activité en fonction du pH :

Protocole opératoire :

Substrat : Solution de CMC de DS 0,58 à 2 p. 1000. La solution est préparée 24 heures avant l'emploi et conservée à 4°

Nous exprimons nos remerciements à Messieurs : P.C. MIRTH et J. STORCK, de l'Industrie Biologique Française, qui nous ont obligeamment procuré les préparations I, II, III, V et VI, ainsi qu'à Messieurs H.DESARMENIEN et P. BASTIEN, des Etablissements Wander, qui nous ont obligeamment procuré les préparations IV et VII.

Enzymes : Solutions aqueuses de cellulases à 2 p. 1000préparées immédiatement avant les essais et centrifugées pendant 10 minutes à 4°

Tampon : Phosphate disodique 0,2M et acide citrique 0,1M.

A 1 ml de solution de CMC à 2 p. 1000, nous ajoutons :

0,25 ml de tampon

0,25 ml de solution de cellulase à 2 p. 1000

1 ml d'eau distillée.

Une goutte de toluène est ajoutée dans chaque tube et l'incubation est faite à 37°. Un témoin enzyme est constitué pour chaque pH et le dosage des sucres réducteurs est réalisé après 6 et 24 heures d'incubation.

Résultats :

a)- Valeurs dues auxtémoins enzymes:

Le tableau IV donne les quantités de saccharides réducteurs totaux libérés par les témoins enzymes après 6 et 24 heures.

Nous constatons la présence d'une quantité importante de saccharides réducteurs qui varie avec :

1) - l'enzyme utilisé

2) - le pH

C'est ainsi que pour la même durée d'incubation : 6 heures, 25 mg des préparations I, II et IV libèrent,

à pH 3,20 : 4,90 mg - 2,50 mg - 4,20 mg et

à pH 4,20 : 6 mg - 4 mg - 5 mg de saccharides réducteurs.

3) - la durée d'incubation

A pH 4,20 ces mêmes quantités d'enzyme libèrent après 6 heures d'incubation : 6 mg - 4 mg - 5 mg et après 24 heures

: 8,25 mg - 6 mg - 10 mg

Les saccharides réducteurs représentent selon les préparations de 24 à 40 p. 100 du poids total. Il est probable que ces saccharides proviennent de l'attaque, par les enzymes associés, de polysaccharides et d'oligosaccharides du milieu de culture des enzymes qui n'ont pas été éliminés lors de la purification assez sommaire de ces préparations commerciales utilisées en pharmacie.

Tous nos résultats expérimentaux qui suivent sont donnés après déduction de la proportion de saccharides réducteurs apportés par les préparations enzymatiques.

b) - Les pH optimums des enzymes :

Les figures 10 et 11 indiquent les courbes d'activité des 4 cellulases en fonction du pH. Ces optimums se situent aux environs de 4.

L'activité maximale est la même par le dosage des sucres réducteurs totaux que par celui du glucose.

La forme de ces courbes montre que l'action des cellulases Pharm. sur la CMC est assez hétérogène. En effet, après 6 heures d'hydrolyse, 2 pics d'activité sont observés : un pic majeur vers 3,5 - 4 et un pic mineur vers 4,5 - 5. Entre 6 et 24 heures, le pourcentage d'hydrolyse augmente plus fortement pour les enzymes agissant vers pH 4,5 - 5 que pour ceux agissant vers 3,5 - 4.

La CMC est le sel d'un acide polycarboxylique. Elle se comporte suivant le pH comme substrat et comme inhibiteur des cellulases(WHITAKER 137).

Au cours de leurs recherches sur les phytases, COURTOIS et LINO d'une part (21), PERLES d'autre part (93) avaient observé une inhibition de la phytase par l'acide phytique.

TABLEAU IV

Valeurs des témoins enzymes en saccharides réducteurs totaux exprimés en glucose libérés par 25 mg d'enzymes à 37° et à différents pH

Enzymes		pH									
		3,2	3,6	3,8	4,0	4,2	4,4	4,6	5,2	5,6	5,8
	I	4,9	5,1	5,2	5,4	6	6	3,4	2,9	2,9	2,9
	II	2,5	3,5	3,7	3,7	4	3,7	3	2	1,5	1,5
	IV	4,2	4,1	4,1	4,9	5	4,5	4,5	4	3,8	3,5
	I	6,1		7,2	7,5	8,25	8,25	4,7	4,0	4,0	4,0
	II	3,7		4,6	5,6	6	5,6	4,5	3	2,2	2,2
						10	9	8	7,5	7	7

Par ailleurs, BERNFELD et coll. (7) ont constaté que beaucoup de polyanions macromoléculaires se comportent comme inhibiteurs des enzymes. Cet effet dépend du groupe électronégatif, de la nature chimique et du poids moléculaire du polyanion. Selon ces auteurs, l'une des explications du phénomène d'inhibition serait la dissociation de la protéine enzymatique par les polyanions avec modification de sa conformation.

- [illegible] en fonction des concentrations du substrat:

Les essais ont été réalisés avec la cellulase I et la CMC de DS 0,58 comme substrat (figure 12). La concentration en cellulase dans le milieu réactionnel est de 0,200 mg par ml, et celles en CMC vont de

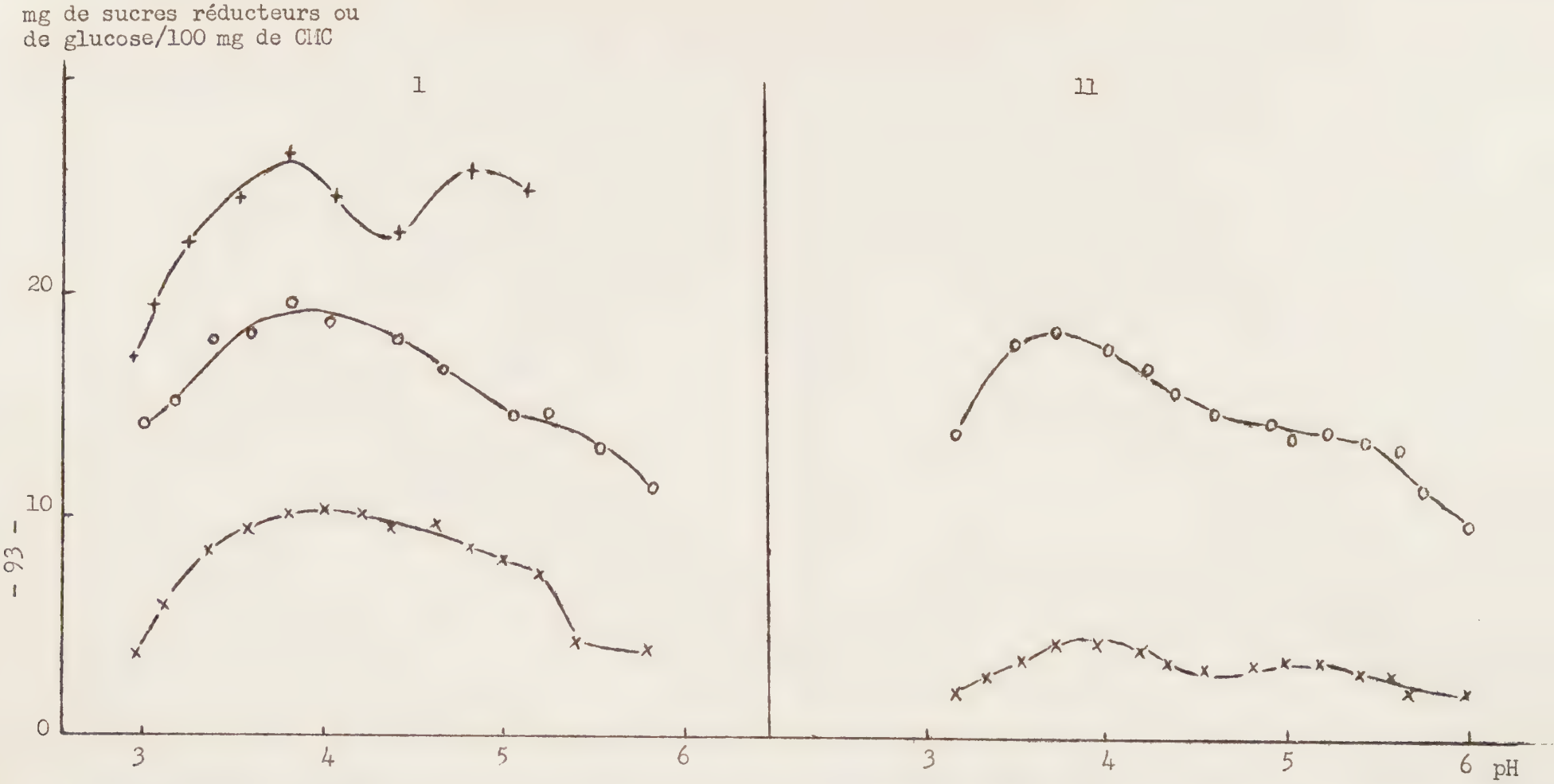


Figure 10 - pH optimum des 2 cellulases I et II. Les valeurs déduites des témoins enzymes sont exprimées en mg de sucres réducteurs totaux ou de glucose pour 100 mg de CMC. Incubation pendant 6 et 24 heures à 37°.

x - glucose dosé par la glucose-oxydase après 6 heures d'incubation —o— sucres réducteurs totaux exprimés en glucose après 6 heures.
\+ - sucres réducteurs totaux exprimés en glucose après 24 heures.

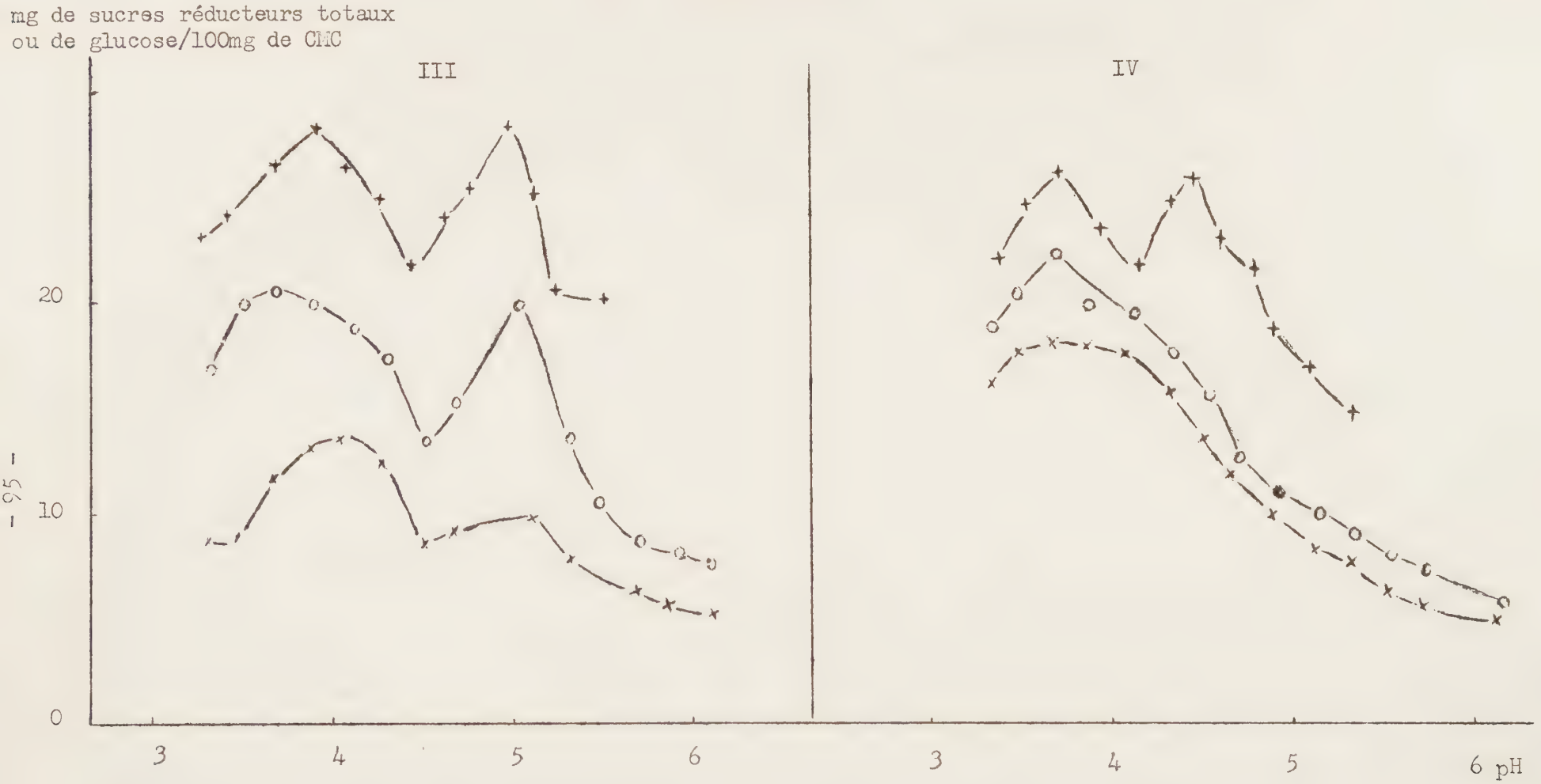


Figure 11 - pH optimum des 2 cellulases III et IV. Les valeurs sont déduites des témoins enzymes et représentées par mg de sucres réducteurs totaux exprimés en glucose ou de glucose pour 100 mg de CMC. Incubation pendant 6 et 24 heures à 37°.

x - glucose dosé par la glucose-oxydase après 6 heures
o - sucres réducteurs totaux exprimés en glucose après 6 heures
+ - sucres réducteurs totaux exprimés en glucose après 24 heures

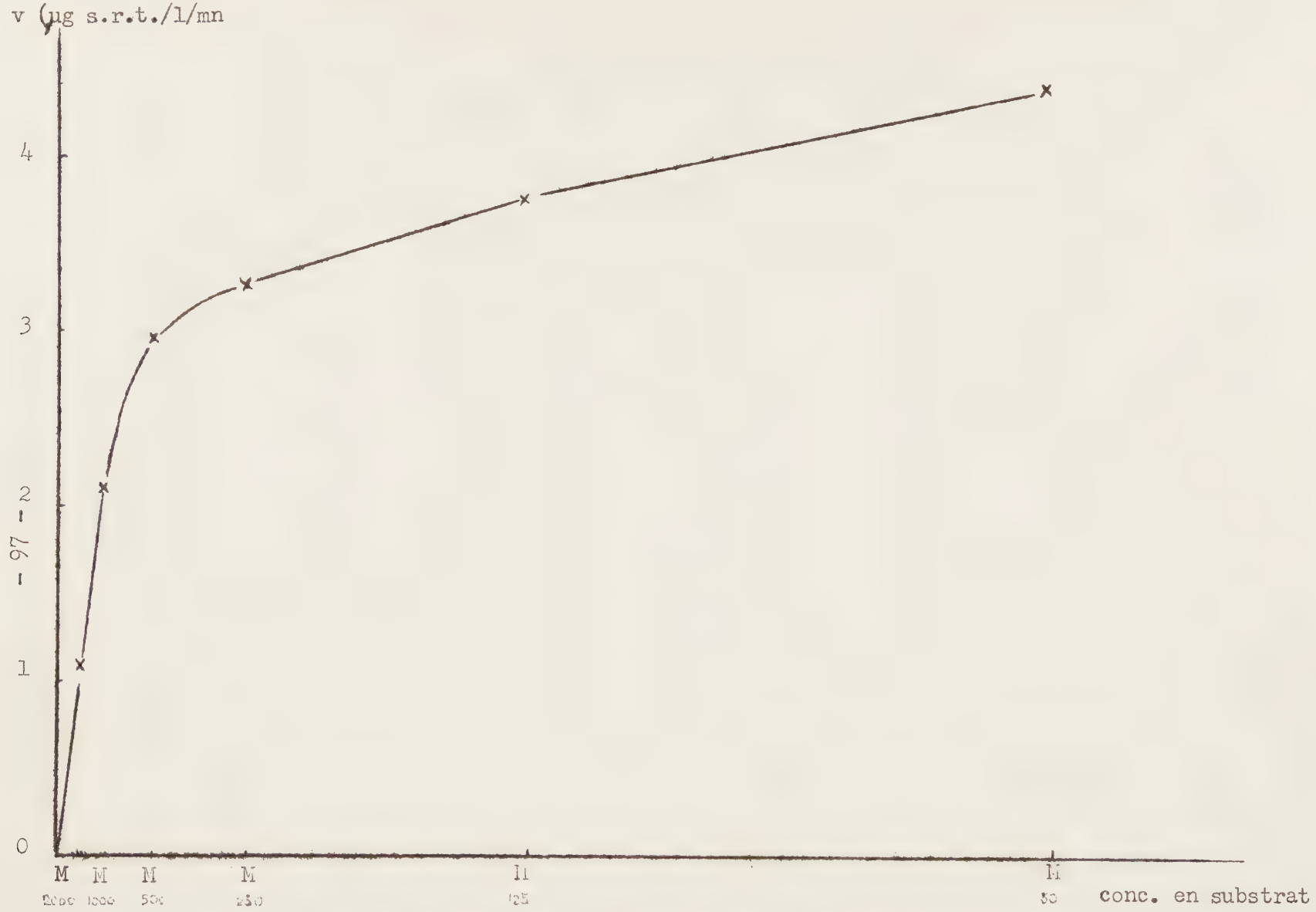


Figure 12 - Activité de la cellulase I en fonction des concentrations de substrat .

en ordonnées : vitesse d'hydrolyse représentée par µg de sucres réducteurs totaux exprimés en glucose par litre de milieu réactionnel par minute.
en abscisses : concentration de substrat dans le milieu réactionnel.

0,100 mg à 4 mg par ml (soit environ M/2000 à M/50 en concentrations molaires).

L'activité enzymatique est déterminée, après 15 minutes d'incubation à pH 4 à 37°, par le dosage des sucres réducteurs totaux par la méthode de SOMOGYI-NELSON.

Comme le montre la figure 12, la vitesse maximale n'a pu être déterminée, la CMC devient difficilement soluble aux concentrations supérieures à M/50.

En outre, les solutions de CMC ayant une concentration supérieure à M/250 sont très visqueuses. La mesure exacte d'un faible volume de ces solutions au moyen d'une pipette ou d'une burette est assez difficile et peu précise en raison de la lenteur d'écoulement qui résulte de la viscosité.

Aussi, nos essais d'activité cellulasique par la mesure de la baisse de viscosité de l'hydrolysat enzymatique se font sur une solution de CMC à une concentration molaire d'environ M/250.

3° - Activité en fonction du DS du substrat :

Les courbes d'hydrolyse (N° 13 à 16) montrent que la vitesse d'hydrolyse décroît lorsque le DS augmente.

: le rapport des vitesses d'hydrolyse de la CMC de DS 0,74 à celles de la CMC de DS 0,58 est d'environ

1/1,5 pour les 4 cellulases.

Cette résistance des dérivés de la cellulose ayant un grand DS est bien connue : les dérivés portant un seul substituant uniformément sur chaque unité d'anhydroglucose sont complètement résistants à l'action des enzymes.

En fait, la substitution de la cellulose ne se fait pas de façon homogène. C'est pourquoi, des dérivés ayant un DS supérieur à I peuvent être attaqués par les enzymes (KLOP et KOOIMAN 66).

4° - Activité en fonction de la durée d'hydrolyse :

Les résultats des figures 13 à 16 sont exprimés en pourcentages d'hydrolyse.

$$\text{pourcentage d'hydrolyse} = \frac{D}{A} \times 100$$

D = mg de saccharides réducteurs exprimés en glucose ou de glucose dosés par la glucose-oxydase, libérés par l'enzyme à partir d'1 mg de CMC, après déduction du témoin enzyme.

A = mg de glucose contenus dans 1 mg de CMC calculé à partir du poids moléculaire moyen.

La détermination de la cinétique d'action des cellulases s'est trouvée difficilement réalisable avec les préparations du commerce.

Nous n'avons pas obtenu de proportionnalité entre la durée d'hydrolyse et les quantités de saccharides libérés. Comme le montre la figure 17, l'hydrolyse débute par une phase très rapide suivie d'une phase plus lente. Cette phase rapide déterminée avec la cellulase I ne dépasse pas 15 minutes. Il est probable que les impuretés de natures diverses, telles que les protéines, les saccharides réducteurs que contiennent les cellulases Pharm. interfèrent dans la détermination de l'activité de ces préparations.

En effet, les protéines sont connues comme ayant sur l'enzyme un effet stabilisateur (WALLENFELL 43), alors que les saccharides réducteurs exercent un effet inhibiteur.

L'hydrolyse de la CMC ne progresse plus après 24 heures; les 4 cellulases donnent environ 30 p. 100 d'hydrolyse avec la CMC de DS 0,58

Figure 13 - Activité de la cellulase I représentée par le p.100 d'hydrolyse en fonction de la durée d'incubation et du DS du substrat - Courbe A : CMC de DS 0,58
Courbe B : CMC de DS 0,74
en ordonnées : p.100 d'hydrolyse - en abscisses: durée d'incubation en heures.
o - sucres réducteurs totaux - x - glucose

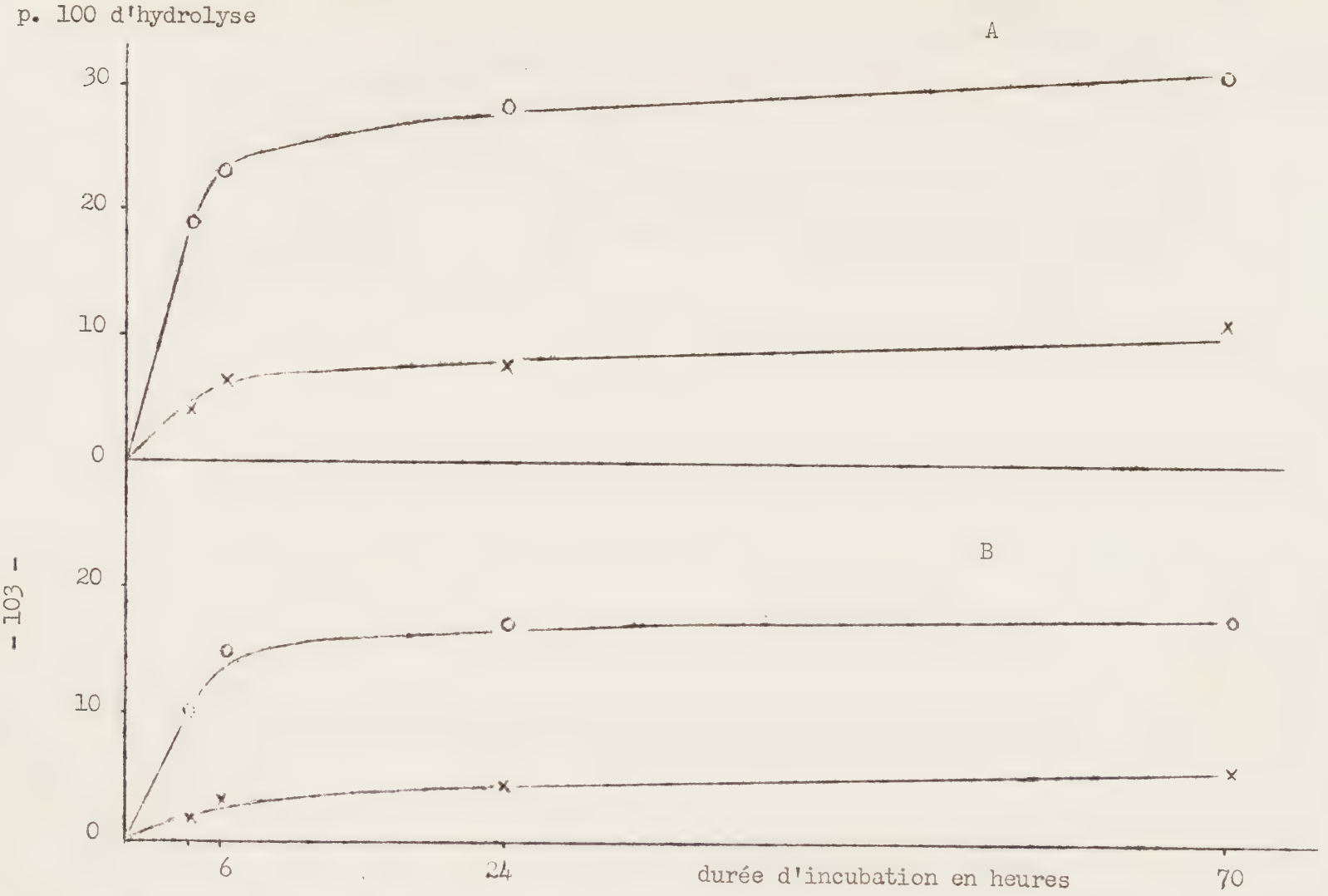


Figure 14 - Activité de la cellulase II en fonction de la durée d'incubation et du DS du substrat - Courbe A : CMC de DS 0,58
Courbe B : CMC de DS 0,74
en ordonnées : p. 100 d'hydrolyse - en abscisses : durée d'incubation en heures
o - sucres réducteurs totaux - x - glucose

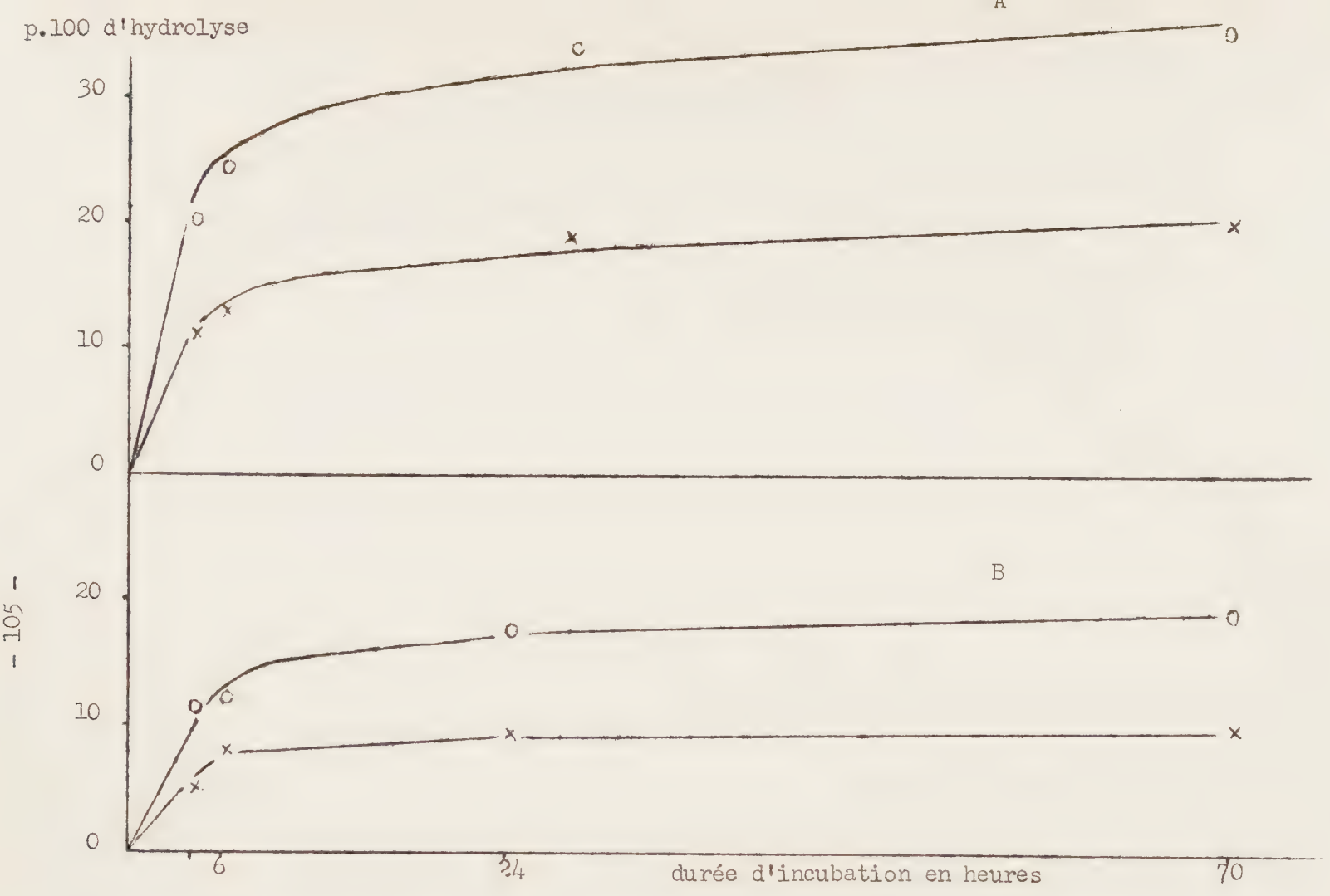


Figure 15 - Activité de la cellulase III en fonction de la durée d'incubation et du DS du substrat; Courbe A : CMC de DS 0,58
Courbe B : CMC de DS 0,74
en ordonnées : p. 100 d'hydrolyse - en abscisses : durée d'incubation en heures
o - sucres réducteurs totaux - x - glucose

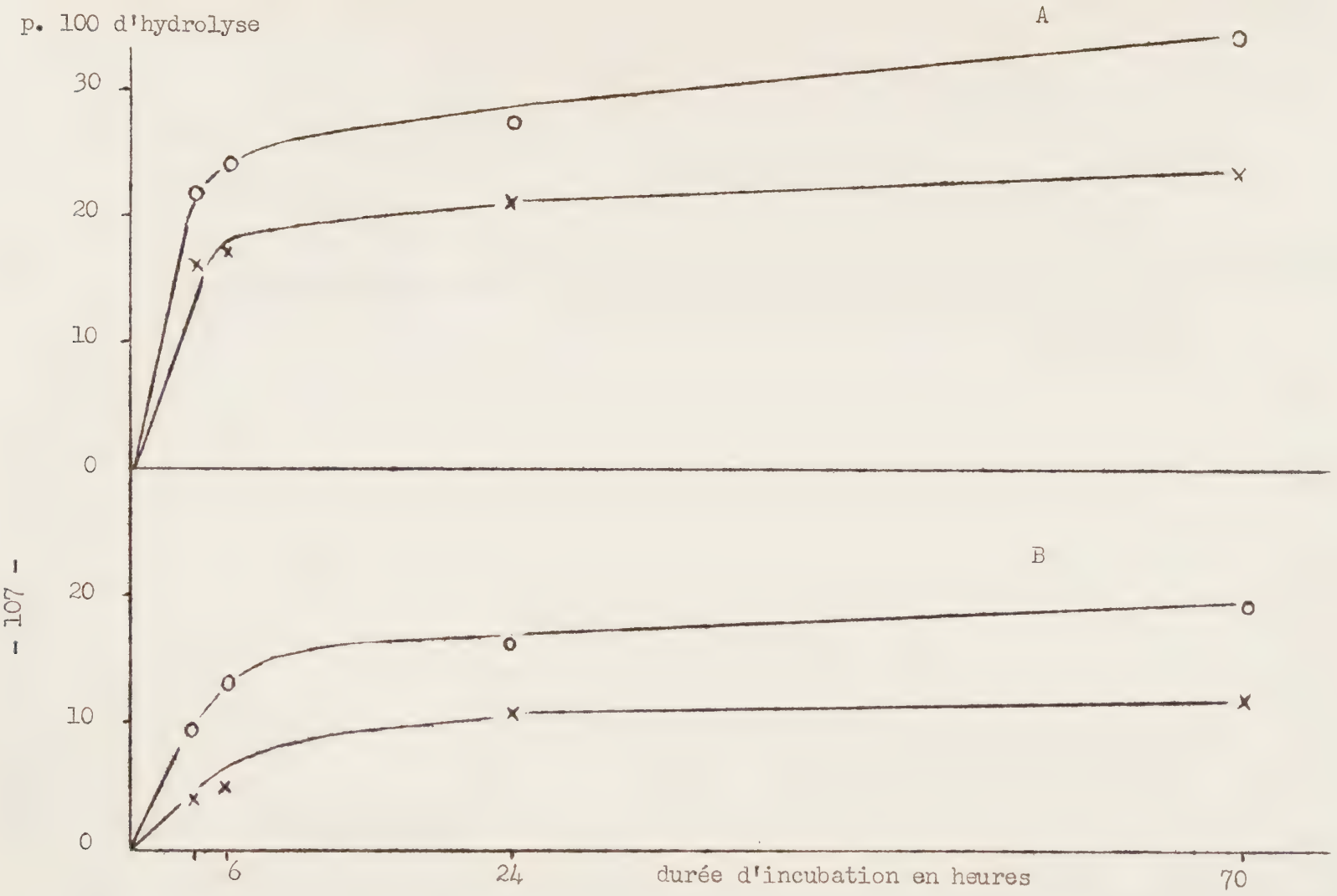


Figure 16 - Activité de la cellulase IV en fonction de la durée d'incubation et du DS du substrat; Courbe A : CMC de DS 0,58
Courbe B : CMC de DS 0,74
en ordonnées : p. 100 d'hydrolyse - en abscisses : durée d'incubation en heures
o - sucres réducteurs totaux - x - glucose

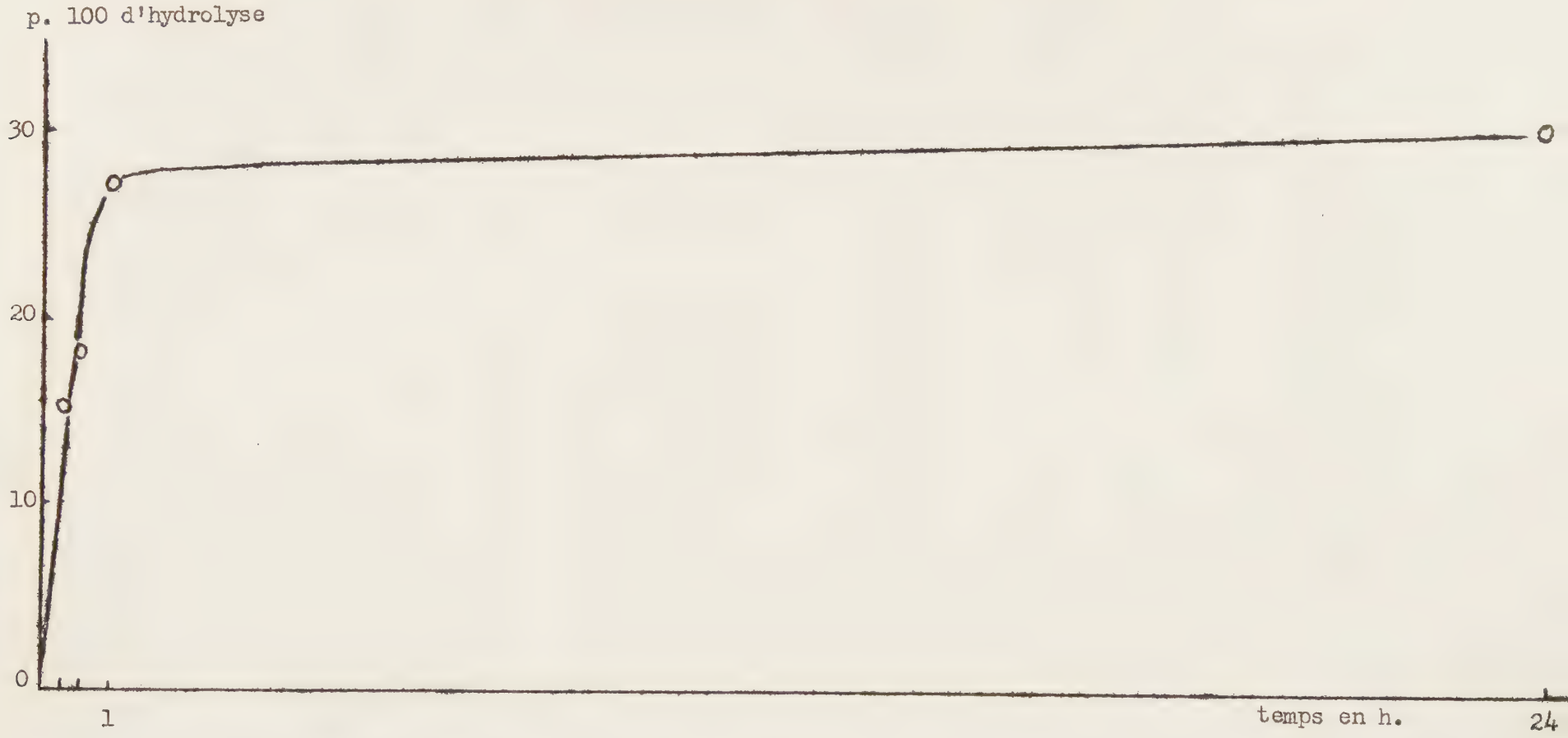


Figure 17 - Activité de la cellulase I sur la CMC de DS 0,58 en fonction de courtes durées d'incubation, déterminée par le dosage des sucres réducteurs totaux.

en abscisses : durée d'incubation en heures
en ordonnées : p. 100 d'hydrolyse.

et 20 p. 100 avec celle de DS 0,74.

HALLIWELL (45) a constaté de même que la cellulase de Myrothecium verrucaria n'agit plus sur la cellulose amorphe après 22 heures de contact. Cette perte d'activité pour une période d'incubation prolongée serait due selon l'auteur à l'instabilité de l'enzyme.

KLOP et KOOIMAN (66) en revanche ont obtenu avec le même Myrothecum verrucaria, après une période d'incubation prolongée, une hydrolyse poussée de la CMC et de l'HEC.
2 CMC de DS 0,61 et 0,80 ont donné respectivement : 42 et 26 p.100 d'hydrolyse.

Il est possible que l'arrêt de l'hydrolyse des CMC par les cellulases Pharm. après 24 heures d'hydrolyse provienne de l'inactivation des enzymes par les protéases associées. En effet, il a été signalé que certaines protéases inactivent les cellulases après une période d'incubation prolongée (REESE et MANDELS,104).

Le rapport glucose dosé par la glucose-oxydase/sucres réducteurs totaux dosés par la méthode de SOMOGYI-NELSON diffère selon les préparations enzymatiques.

Après 24 heures d'hydrolyse et avec la CMC de DS 0,58 ces rapports sont de : 0,53 pour la cellulase I - 0,26 pour la cellulase II - 0,65 pour la cellulase III et 0,80 pour la cellulase IV.

La différence entre ces rapports provient de la différence de l'activité cellobiasique des préparations.

5° - Détermination de l'activité cellobiasique des cellulases-Pharm.

A 1 ml de solution de cellobiose à 2 p. 1000, nous ajoutons :

1 ml d'eau distillée

0,[illegible] ml de solution de cellulase à 2 p. 1000

0,25 ml de tampon phosphate disodique 0,2 M acide citrique 0,1 M au pH optimum des cellulases (pH 4).

Un témoin enzyme sans substrat et un témoin substrat cellobiose sont constitués en même temps. Après 3 heures d'incubation à 37°, le glucose libéré est dosé par la glucose-oxydase.

Le tableau V donne l'activité cellobiasique des 4 préparations.

TABLEAU V

Activité cellobiasique des 4 cellulases Pharm.

	Témoin cellobiose	Préparations : I	II	III	IV
µg de glucose/100 µg de cellobiose	3	21	12	41	48

Le résultat du dosage de l'activité cellobiasique des préparations concorde avec celui du dosage de leur activité cellulasique : les préparations les plus riches en cellobiase sont celles qui libèrent le plus de glucose dans l'hydrolyse de la CMC. Ainsi le dosage de l'activité cellulasique par la détermination des quantités de sucres réducteurs libérés ne reflète dans le cas des cellulases-Pharm., que de façon imparfaite l'action dépolymérisante de ces préparations.

Nous remarquons que la glucose-oxydase que nous utilisons n'est pas exempte de cellobiase : il y a hydrolyse du cellobiose témoin avec libération de 3 µg de glucose à partir de 100 µg de cellobiose (le

cellobiose qui a servi au dosage ne contient pas de glucose libre. Sa pureté a été auparavant contrôlée par chromatographie sur papier).

6° - Etude sommaire des produits de l'hydrolyse enzymatique

Nous avons recherché, par chromatographie sur papier, d'une part la présence d'acide glycolique, d'autre part celle d'oligosaccharides libérés par l'enzyme.

L'hydrolysat obtenu par une incubation de 24 heures de la CMC de DS 0,62 avec la préparation I est inactivé par chauffage de 20 minutes au bain-marie bouillant. Il est ensuite concentré au 1/5 et soumis à la chromatographie descendante sur du papier Schleicher - Schüll.

Nous avons employé un solvant acide pour développer les chromatogrammes servant à rechercher l'acide glycolique.

acétate d'éthyle / n-butanol / acide acétique / eau

3 4 2,5 4 en volumes.

Pour la recherche de saccharides réducteurs, nous avons employé un solvant alcalin

butanol / pyridine / eau

9 5 4 en volumes.

La révélation de l'acide glycolique est faite avec le réactif de NORDMANN (88) qui est un indicateur de pH.

0,1 g de phénolphtaléine

0,20 g de rouge de méthyle

0,30 g de diméthylaminobenzène

0,40 g de bleu de bromothymol

0,50 g de bleu de thymol

sont dissous dans 500 ml d'alcool absolu. Ce réactif colore les acides en rouge ou orangé, le fond du papier est coloré en jaune.

La révélation des oligosaccharides est faite avec :

1°) le réactif de PETEK (4)

0,10 g de β naphtylamine

1 g de thymol sont dissous dans 150 ml d'éthanol à 80°

On ajoute, après dissolution :

2 ml d'acide phosphorique à 80 p. 100

Le réactif donne après chauffage à 105° une coloration marron avec les hexoses et jaune avec les cétoses.

2°) le réactif à l'orthophénylène diamine

0,50 g d'orthophénylène diamine sont dissous dans 75 ml d'éthanol

2,50 g d'acide oxalique sont dissous dans 50 ml d'eau distillée

Les 2 solutions sont ensuite mélangées avant l'emploi. Ce réactif donne après chauffage à 100° une coloration bleue avec les aldoses et gris bleu avec les cétoses.

La recherche d'acide glycolique a toujours été négative : aucune des 4 préparations n'a rompu les liaisons éther-oxyde de la cellulose.

Quant aux oligosaccharides libérés, 2 ont été détectés : le glucose et un oligosaccharide, dont la mobilité chromatographique par rapport au glucose est de 0,1.

7° - Détermination de l'activité cellulasique par viscosimétrie

La viscosité a été utilisée pour déterminer les dimensions moléculaires des polymères biologiques : ADN, ARN et leur concentration en solution. Le DP de la cellulose a été déterminé par la mesure de la viscosité de l'ester nitrique de toutes les fonctions alcool libres de la cellulose.

Cette méthode a été employée également pour étudier les enzymes tels que : pepsine par NORTHROP et HUSSEY(89), amylase par BAMANN et

MYRBACK (5) et hyaluronidase par HULTIN (52).

Expérimentalement, il a été trouvé que la viscosité des solutions de polymères variait avec différents facteurs parmi lesquels :

- la taille des molécules
- le volume réellement occupé par la molécule ou effet de solvatation.

La dépolymérisation d'une macromolécule qui provoque une diminution de la taille de la molécule s'accompagne d'une baisse de viscosité.

Nous pouvons donc apprécier le degré d'hydrolyse des dérivés solubles de la cellulose par viscosimétrie. Dans le cas d'une attaque des milieux de chaîne (comme c'est souvent le cas avec les cellulases) un petit nombre de coupures des liaisons osidiques provoque une baisse importante de viscosité. Or, la CMC se prête très mal à des déterminations de viscosité, si sa solution contient des sels : sa viscosité baisse en présence de sels et varie avec le pH.

Viscosité de la CMC en présence de sels :

Comme le montre la figure 18, cet effet est plus important vers pH 2 - 3 dans nos conditions opératoires qu'à pH plus élevé.

La viscosité de la CMC dépend en grande partie de l'effet de solvatation (RINAUDO 106); selon les configurations de la chaîne qui s'étire ou qui se contracte, on a une viscosité qui augmente ou qui diminue. De par la présence de substituants ionisés sur sa molécule, la CMC se comporte comme un électrolyte à faible concentration. L'addition de sels à cette solution aqueuse provoque un effet de répulsion entre les charges : les chaînes de CMC se replient, d'où résulte une baisse de viscosité. L'addition d'alcool a un effet analogue : elle produit la désolvatation

et contraction de la molécule.

Viscosité des hydrolysats enzymatiques :

A 8 ml d'une solution de CMC à 2 p. 1000 préparée la veille et conservée à 4°, nous ajoutons :

1 ml de tampon acide citrique 0,1 M, phosphate disodique 0,2 M et 1 ml d'une solution de cellulase I préparée avant les essais et centrifugée 10 minutes à 4°.

La détermination de la viscosité de l'hydrolysat se fait à 25° après 15 minutes d'incubation à la même température.

Cette détermination se heurte ici à des difficultés. En effet, la diminution de viscosité provoquée par la force ionique du tampon est très importante et réduit de ce fait la viscosité initiale des solutions de CMC.

Comme le montre la figure 19, la dépolymérisation ultérieure par les cellulases, se trouvant même à des concentrations très basses dans le milieu, (20 et 40 µg par ml de milieu réactionnel) conduit à une solution ayant une viscosité proche de celle de l'eau ($\eta_{sp} \# 0,5$). Sur ce milieu, l'action de différentes doses de cellulase se traduit par des différences de viscosité très faibles, qui ne sont pas déterminées avec précision par notre appareil.

La CMC apparaît donc comme un substrat peu favorable pour le dosage des cellulases par viscosimétrie. IWASAKI et coll. (55) ont d'ailleurs formulé la même remarque et ont estimé que l'HEC est préférable à la CMC pour la détermination de l'activité cellulasique par viscosimétrie.

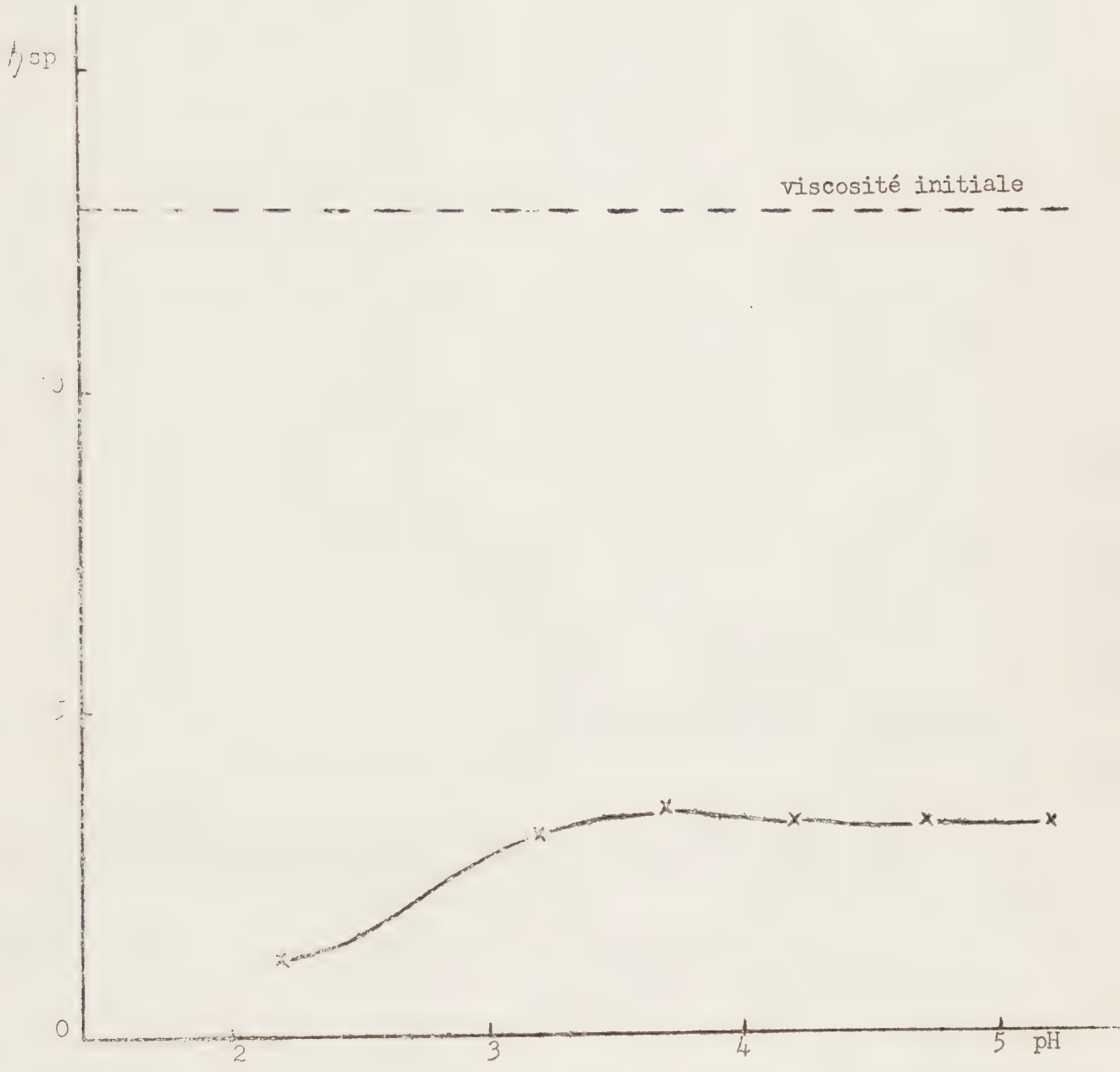


Figure 18 - Viscosité d'une solution de CMC à 0,16 p. 100 en fonction du pH.

Tampon acide citrique : 0,01 M
Phosphate disodique : 0,02 M dans le milieu
Mesure de la viscosité à 25°

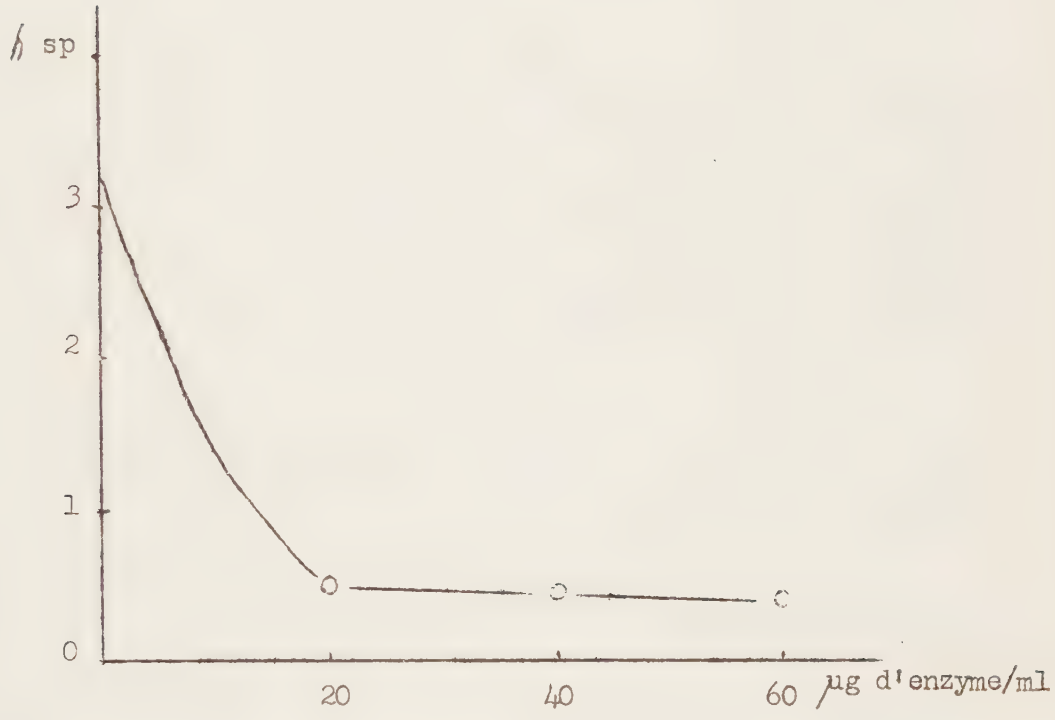


Figure 19 - Activité de la cellulase I sur la CMC à une concentration de 1,6 p. 1000, mesurée par la baisse de viscosité

en ordonnées : η sp de l'hydrolysat enzymatique
en abscisses : µg de cellulase par ml du milieu réactionnel

B) - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'HEC :

L'hydrolyse enzymatique de l'HEC est réalisée par les 3 cellulases: V, VI et VII, distinctes de celles utilisées pour hydrolyser la CMC.

L'activité de ces préparations a été déterminée en fonction

: du pH

: des concentrations d'enzyme.

Le degré d'hydrolyse est déterminé par le dosage des sucres réducteurs totaux libérés par la méthode au ferricyanure de potassium en milieu alcalin HOFFMAN (50), par celui du glucose libéré par la glucose-oxydase, ainsi que par l'évaluation de la baisse de viscosité relative de l'hydrolysat.

1°) - Activité en fonction du pH :

A 2 ml d'HEC à 1 p. 1000, préparée 24 h. avant l'emploi et conservée à + 4°, nous ajoutons :

0,25 ml de tampon phosphate disodique 0,2 M, acide citrique 0,1 M

0,25 ml d'une solution de cellulase à 1 p. 1000.

Un témoin, contenant la préparation enzymatique sans adjonction de substrat ou témoin enzyme, est constitué pour chaque pH.

2 gouttes de toluène sont ajoutées dans chaque tube et l'hydrolyse dure 1 heure à 37°.

La figure 20 réunit les pH optimums des 3 cellulases.

Résultats :

Les courbes sont nettement plus aplaties que celles établies avec les 4 cellulases réagissant sur la CMC. Elles représentent l'action de l'ensemble des enzymes associés dans ces préparations. Le pH optimum peu accentué se situe vers 4,5 alors que les cellulases agissant sur la

CMC montrent un pH optimum net vers pH 4.

L'effet de la nature du substrat sur le pH optimum des cellulases a déjà été signalé par divers auteurs.

TOYAMA (125) a constaté que la cellulase de Trichoderma koningi non purifiée a une activité optimale vers 4,5 quand elle agit sur la CMC et une activité optimale vers 5 quand elle agit sur la cellulose insoluble non ionisée.

Cette même cellulase purifiée (LI et coll.72) montre un pH optimum très net vers pH 5,3 quand elle agit sur la CMC, et présente une zone d'activité maximale assez large vers pH 4,2 quand elle agit sur la cellulose amorphe.

2°) - Activité en fonction des concentrations d'enzyme:

Nous avons d'abord cherché à connaître le degré d'hydrolyse de l'HEC en employant des fortes concentrations d'enzyme et une période d'incubation prolongée.

Nous avons ensuite étudié la relation entre activités enzymatiques et concentrations des enzymes, en utilisant de faibles concentrations d'enzymes et une dose constante de substrat.

a/ - Hydrolyse de l'HEC par de fortes concentrations d'enzyme

Le milieu réactionnel contient par ml :

0,800 mg d'HEC

0,10 ml de tampon de pH 4,5

0,075 à 0,75 mg de cellulase.

L'incubation faite à 37° dure 7 et 24 heures. Pour chaque concentration en enzyme, un témoin sans substrat est établi.

Résultats :

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hydrolyse qui

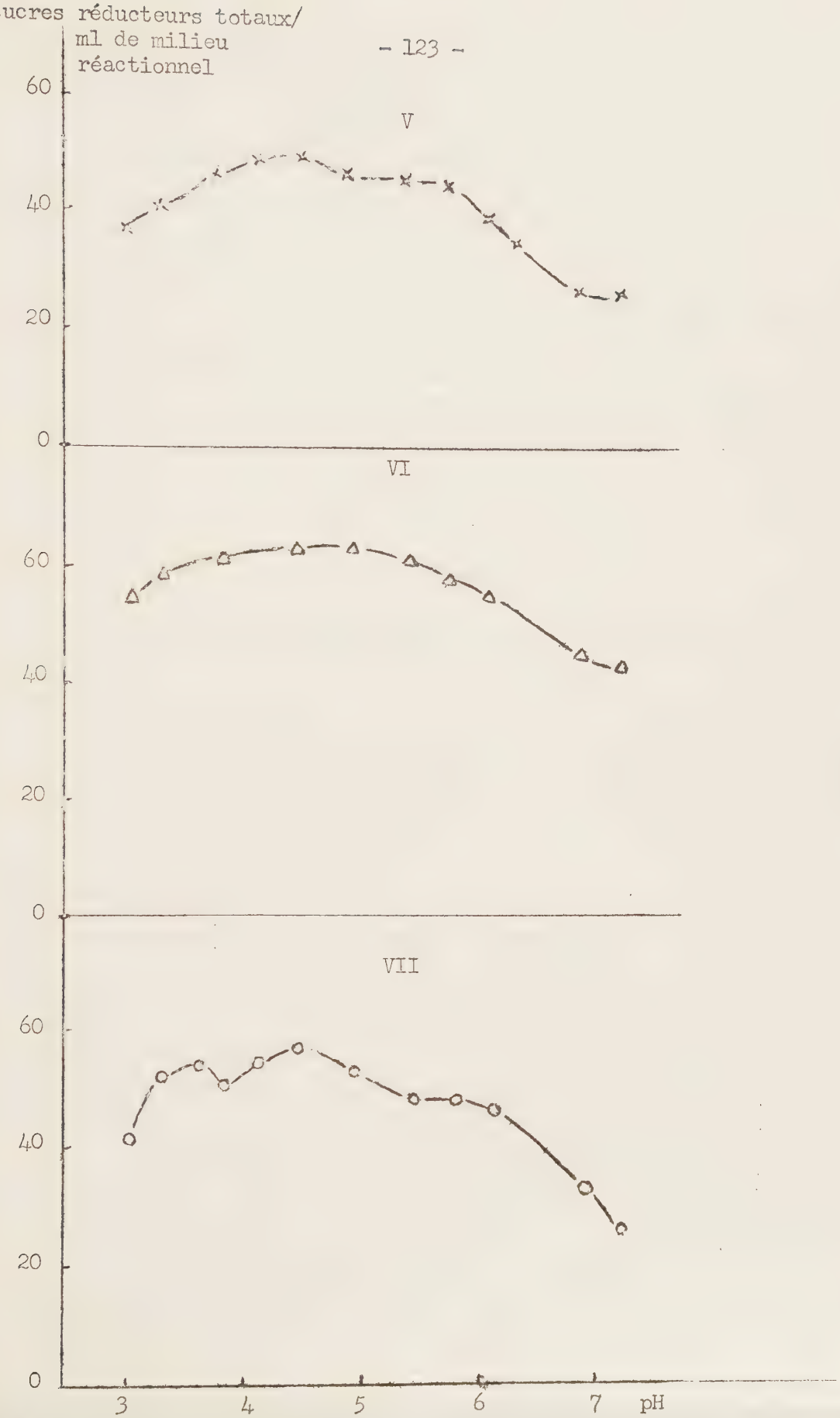


Figure 20 - Courbes de pH optimums de 3 cellulases V, VI et VII.

en ordonnées : ug de sucres réducteurs totaux exprimés en glucose/ml du milieu réactionnel.

en abscisses : pH

est calculé d'après les valeurs données par l'hydrolyse acide de l'HEC

$$\text{p. 100 d'hydrolyse} = \frac{D}{A} \times 100$$

D : mg de sucres réducteurs totaux exprimés en glucose, ou mg de glucose dosés par la glucose-oxydase, déduits du témoin enzyme, libérés dans I ml du milieu réactionnel.

A : mg de sucres réducteurs totaux exprimés en glucose, libérés par l'hydrolyse acide à partir d'un ml du milieu réactionnel.

Le tableau suivant donne les valeurs des témoins enzymes. Ces derniers, comme ceux utilisés dans l'essai de la CMC, libèrent une forte proportion de sucres réducteurs.

TABLEAU VI

Valeurs des témoins enzymes après 24 heures d'incubation

Cellulases	mg de sucres réducteurs totaux contenus dans 100 mg d'enzyme	mg de sucres réducteurs totaux pour 100 mg trouvés dans le milieu réactionnel
V	30	46
VI	11	40
VII	50	76

L'hydrolyse acide de l'HEC a donné environ 36 p. 100 de glucose non substitué. Le plus fort pourcentage d'hydrolyse de ce substrat par action des cellulases se limite à 20 p. 100 de sucres réducteurs totaux dont 5,3 p. 100 de glucose (Tableau VII)

TABLEAU VII

Pourcentages d'hydrolyse de l'HEC après 7 heures d'incubation

Quantités de cellulases	Enzymes n° V		VI		VII	
	Glu	Sac.réd.	Glu	Sac. réd.	Glu	Sac.réd.
75	1	10	3,4	13,8	2,9	10,1
150	1,2	11,3	3,9	15,6	4,2	12,5
500	2,5	12,4	4,9	17,1	4,9	17,4
750	2,5	14	5	17,1	5	18,7
après 24 heures d'incubation						
75	1,7	11,7	3,9	15,6	3,7	13,5
150	2	13,4	4,9	16,8	4,5	15
500	4	13,7	5,7	20,2	5,3	18,7
750	4,3	14,8	5,7	20,2	5,3	18,7

Les chiffres du tableau représentent les pourcentages d'hydrolyse par rapport à l'hydrolyse acide.

Glu : p.100 de glucose libéré.

Sac.réd. : p.100 de saccharides réducteurs libérés exprimés en glucose.

Donc, les cellulases ne libèrent pas toutes les unités de glucose non substitué, fait déjà constaté par KLOP et KOOIMAN (66) avec les cellulases de Myrothecium verrucaria et de Luizyme.

Les vitesses d'hydrolyse, de même que celles déterminées avec la CMC comme substrat, n'augmentent pas après 24 heures d'incubation.

La quantité de glucose libéré dépend de l'activité cellobiasique des préparations comme nous l'avons indiqué page 111. Ces activités sont respectivement de 1 : 70 : 55 pour les cellulases V : VI : VII.

b/ - Activité en fonction de faibles concentrations d'enzyme :

Le substrat, à une concentration fixe, est hydrolysé par des quantités croissantes d'enzyme.

A 2 ml de solution d'HEC à 0,4 p. 100, nous ajoutons :

0,25 ml de tampon de pH 4,5

0,25 ml de solution contenant de 0,100 à 0,600 mg de cellulase par ml

Après 3 heures d'incubation à 37°, l'activité enzymatique est déterminée par le dosage des sucres réducteurs totaux et du glucose.

La figure 21 montre que l'activité des cellulases ne se trouve pas être directement proportionnelle à laquantité d'enzyme. Pour les cellulases VI et VII riches en cellobiase les quantités de glucose libérées dans le milieu contenant moins de 40 µg de cellulase par ml sont en relation directe avec celles des enzymes.

Ce manque de proportionnalité entre les sucres réducteurs libérés et les quantités d'enzyme résulterait soit : de la présence de multiples enzymes agissant sur le substrat, soit de la non homogénéité du substrat: le DS et la taille des dérivés cellulosiques (MILLER et coll.79).

Certaines relations déduites des résultats expérimentaux ont été mentionnées par les auteurs (PRINGSHEIM et BAUR 101).

Par exemple, en doublant la concentration d'enzyme, l'activité initiale se trouve augmentée de 1,2 à 1,8. Cette relation dépend du substrat utilisé et ne s'applique pas à toutes les cellulases.

3°) - Détermination de l'activité cellulasique par viscosimétrie:

LEVINSON et REESE (71) ont constaté que la cellulase de Myrothecium verrucaria, agissant sur des dérivés solubles de la cellulose, provoquait une diminution de viscosité qui était proportionnelle aux quantités d'enzymes et cette proportionnalité se produit pour une concentration donnée d'enzymes.

IWASAKI et coll. ont montré que l'on pouvait doser la cellulase partiellement purifiée de Trichoderma koningi par la mesure de la baisse de viscosité de l'hydrolysat enzymatique (55).

Nous avons ainsi été amené à étudier cette méthode physique de dosage et à déterminer les conditions où elle est applicable avec les cellulases Pharm. d'origines diverses.

a) - Diminution de viscosité en fonction de la durée d'hydrolyse:

A 8 ml de solution aqueuse d'HEC à 2 p. 100, nous ajoutons :

1 ml de tampon acide citrique 0,1 M phosphate disodique 0,2 M de pH 4,5

1 ml de solution de cellulase VI à 0,2 p. 100

L'hydrolyse est effectuée à 25° et la mesure de la viscosité est faite à la même température (figure 22).

La viscosité initiale du substrat est déterminée sur une solution contenant les mêmes quantités de réactifs mais où l'enzyme est inactivé par chauffage de 20 minutes au bain-marie bouillant. Cette mesure a pour but d'éliminer l'interférence possible des impuretés de la préparation enzymatique (sels - protéines) sur la viscosité.

Nous exprimons la diminution de viscosité Dim-visc ou augmentation de fluidité par la relation suivante :

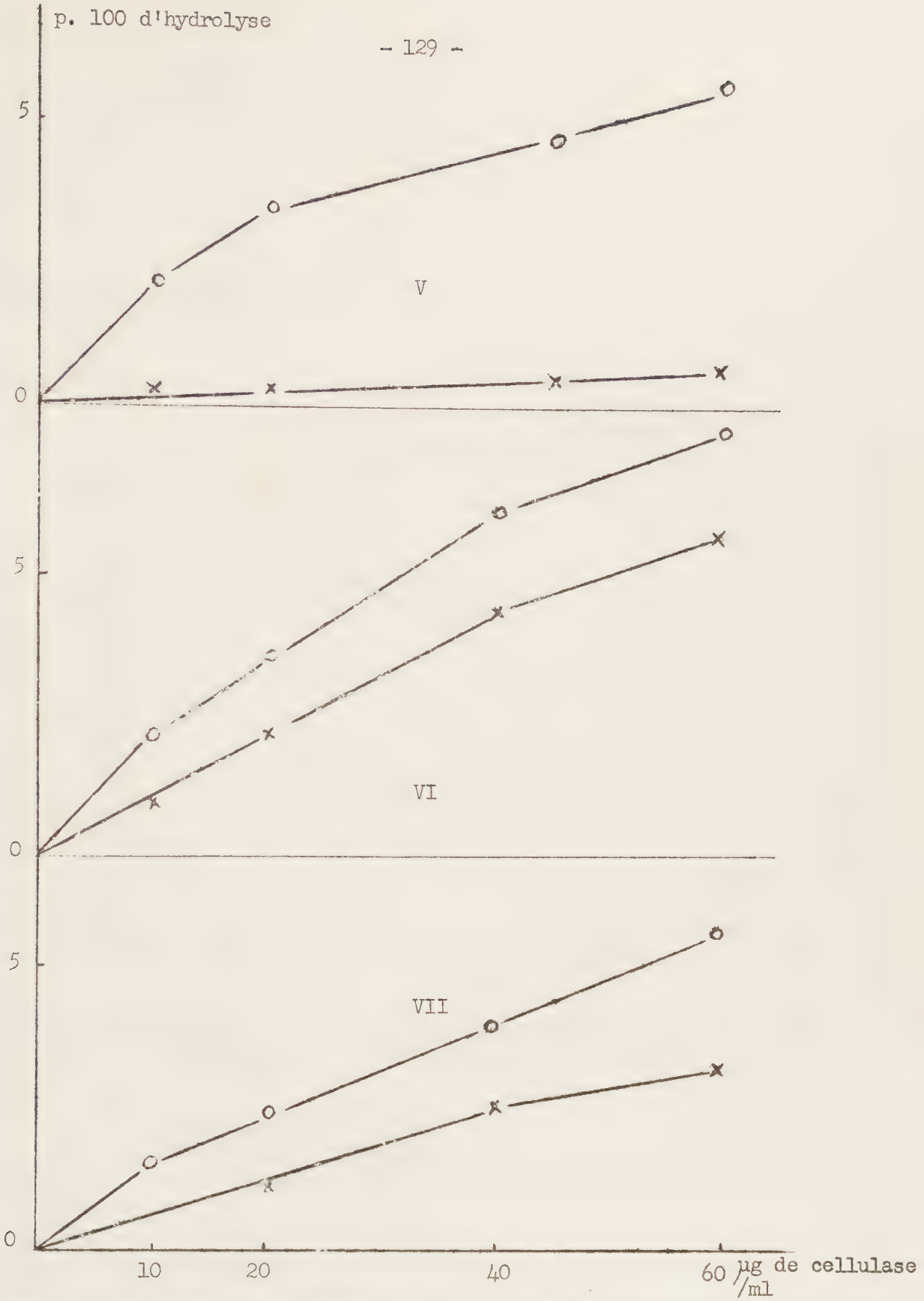


Figure 21 - Activités représentées par des p. 100 d'hydrolyse des 3 cellulases V, VI et VII en fonction des concentrations variées d'enzyme avec une dose constante de substrat après 3 heures à 37°.
o——sucres réducteurs totaux; x——glucose
en ordonnées : p. 100 d'hydrolyse
en abscisses : concentration en cellulase : µg/ml

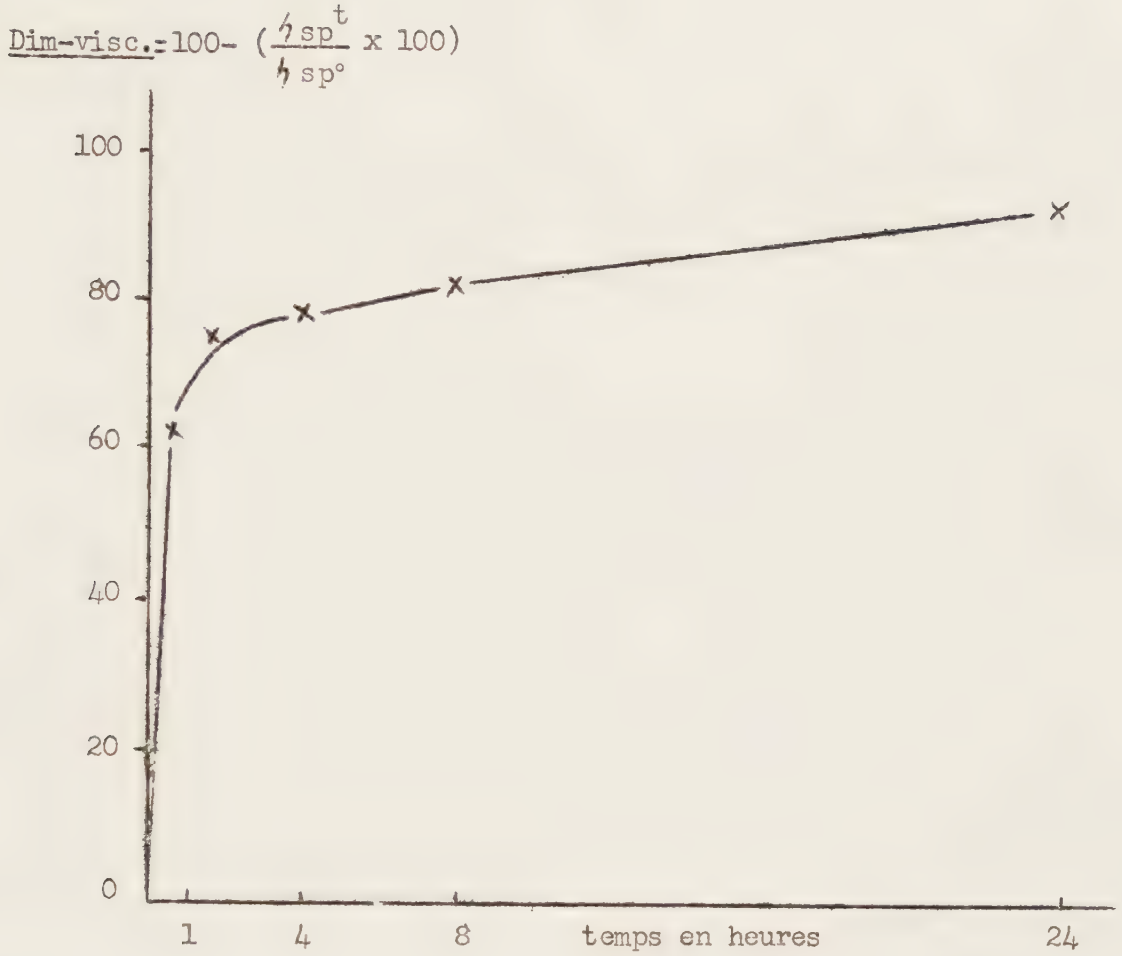


Figure 22 - Diminution de viscosité (Dim-visc) d'une solution d'HEC en présence de cellulase VI, en fonction de la durée d'hydrolyse.

viscosité mesurée à 25°
en ordonnées : Dim-visc
en abscisses : durée d'hydrolyse en heures.

$$\text{Dim-visc.} = 100 - \left(\frac{\eta sp^t}{\eta sp^\circ} \times 100\right)$$

ηsp° : viscosité spécifique au temps t = 0

ηsp^t : viscosité spécifique au temps t

Résultats :

Après 30 minutes d'incubation, la Dim-visc. atteint 60 p. 100 Cette baisse est ensuite beaucoup plus lente et atteint 90 p. 100 après 24 heures. Il y a donc une phase initiale rapide suivie d'une série de réactions plus lentes.

b) - Diminution de la viscosité en fonction des quantités d'enzyme.

Le milieu réactionnel contient par ml : 16 mg d'HEC et des concentrations en enzyme allant de 0,020 à 0,200 mg.
La durée de réaction est de 30 minutes à 25°
La figure 23 groupe les résultats obtenus avec les 3 cellulases.
De 0 à 25-30 p.100 de Dim-visc, se situe la zone favorable pour le dosage, zone où il y a proportionnalité entre les doses d'enzyme et la baisse de viscosité.

Nous avons voulu par ailleurs, nous assurer de la précision du dosage. Cette précision est mesurée par k fois l'écart-type et dépend du nombre de mesures et de la valeur de la probabilité choisie. Nous adoptons la probabilité de 95 p.100 soit P = 0,05 et utilisons pour calculer la marge de variation probable des moyennes de nos mesures le coefficient de STUDENT afférent à l'étude de petits nombres d'échantillons. Le tableau VII reproduit les résultats d'une série de 5 mesures faites avec la cellulase VII. Un écart de 0,13 affecte aussi bien les essais sans cellulase que les essais d'hydrolyse enzymatique. Cet écart ne dépasse pas la précision fournie par l'appareil.

TABLEAU VII

Comparaison des résultats

de cinq séries indépendantes de dosages.

Concentration de la préparation enzymatique en µg/ml	Série de mesure : N° (1)					x̄ (2) : Valeur moyenne	x̄ ± σ (3)	x̄ ± σ t (4) P = 0,05
	1	2	3	4	5			
0	4,33	4,45	4,16	4,30	4,30	4,31	4,31 ± 0,046	4,31 ± 0,13
20	4,12	4,14	3,88	4	4,02	4,03	4,03 ± 0,046	4,03 ± 0,13
40	3,89	3,83	3,61	3,72	3,79	3,77	3,77 ± 0,048	3,77 ± 0,13
60	3,63	3,62	3,40	3,48	3,44	3,51	3,51 ± 0,047	3,51 ± 0,13
80	3,30	3,29	3,13	3,27	3,32	3,26	3,26 ± 0,012	3,26 ± 0,03
100	2,94	3,10	2,85	2,85	2,85	2,92	2,92 ± 0,028	2,92 ± 0,08
200	2,54	2,52	2,35	2,48	2,35	2,45	2,45 ± 0,041	2,45 ± 0,11

(1) Viscosité spécifique du mélange réactionnel renfermant 0,016 g par ml d'HEC et la préparation enzymatique VII. Hydrolyse à 25° et à pH 4,5.
(2) x̄ : moyenne des résultats.
(3) σ : écart-type. (4) t = coefficient de Student pour P = 0,05
(5) P : 0,05 : pour un intervalle de confiance de 95 p. 100.

c) Action des cellulases sur les solutions d'HEC conservées à la glacière :

Il a été signalé que les solutions des dérivés cellulosiques fraîchement préparées étaient beaucoup mieux hydrolysées que celles conservées depuis un certain temps à la glacière. (JERMYN 58). Cet effet serait dû selon l'auteur à la formation par repos des solutions, d'agrégats résistant à l'action des enzymes.

Nous avons voulu vérifier si la mesure de l'activité enzymatique par viscosimétrie est affectée par le vieillissement des solutions.

Une solution d'HEC à 2 p. 100 préparée selon le protocole indiqué page 34est conservée à la glacière. La détermination de l'activité enzymatique est faite après 1,7 et 15 jours d'intervalle avec la cellulase VI. La solution de cellulase est préparée immédiatement avant les essais.

TABLEAU VIII

Détermination par viscosimétrie de l'activité de la cellulase VI agissant sur une solution d'HEC conservée à la glacière.

Durée de conservation de la solution d'HEC (en jours)	η_{sp} du substrat témoin	η_{sp} après action de 40 µg de cellulase	Dim-visc : $100-\left(\frac{\eta_{sp}^{t}}{\eta_{sp}^{o}} \times 100\right)$
1	4,40	3,85	12,50
7	4,45	3,88	12
15	4,18	3,67	12

Le tableau VIII montre que la viscosité de la solution à pâte initiale d'HEC diminue de 5 p. 100 après 15 jours de conservation, et que la viscosité de l'hydrolysat enzymatique diminue dans les mêmes proportions.

Nos résultats étant exprimés en une baisse relative de viscosité, il s'ensuit que la Dim-visc résultant de l'action de l'enzyme est la même sur une solution d'HEC fraîchement préparée que sur celle conservée à la glacière depuis 15 jours.

d)Mode d'expression des résultats :

La Commission de standardisation des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie a prévu le cas des enzymes, dont l'activité n'est pas habituellement mesurée par une réaction chimique, mais par des modifications physiques comme un changement de viscosité. Leur activité ne peut être exprimée selon les unités adoptées par la Commission.

Elle souhaite que les modifications physiques puissent être reliées à des modifications chimiques pour établir un facteur de conversion. Dans l'état actuel de nos connaissances sur l'hydrolyse cellulasique de l'HEC, ce facteur de conversion n'est pas encore établi.

Lorsque l'emploi de cellulases purifiées aura permis de fixer la relation entre le nombre de liaisons osidiques hydrolysées dans l'HEC et la diminution de viscosité, il sera alors possible de proposer des Unités reliées à celles déterminées par voie chimique.

Pour le moment, nous envisageons un mode arbitraire d'évaluation de l'activité cellulasique par viscosimétrie. Nous proposerons de définir l'unité comme représentant la quantité d'enzyme qui provoque une diminution de viscosité de un pour cent en une minute.

Si l'on rapporte le nombre d'Unités à un gramme de préparation cellulasique, le nombre d'unités dans nos conditions opératoires (30 minutes à 25°) sera calculé d'après :

$$\text{unités par gramme} = \frac{\text{Dim-visc}}{30 \times p}$$

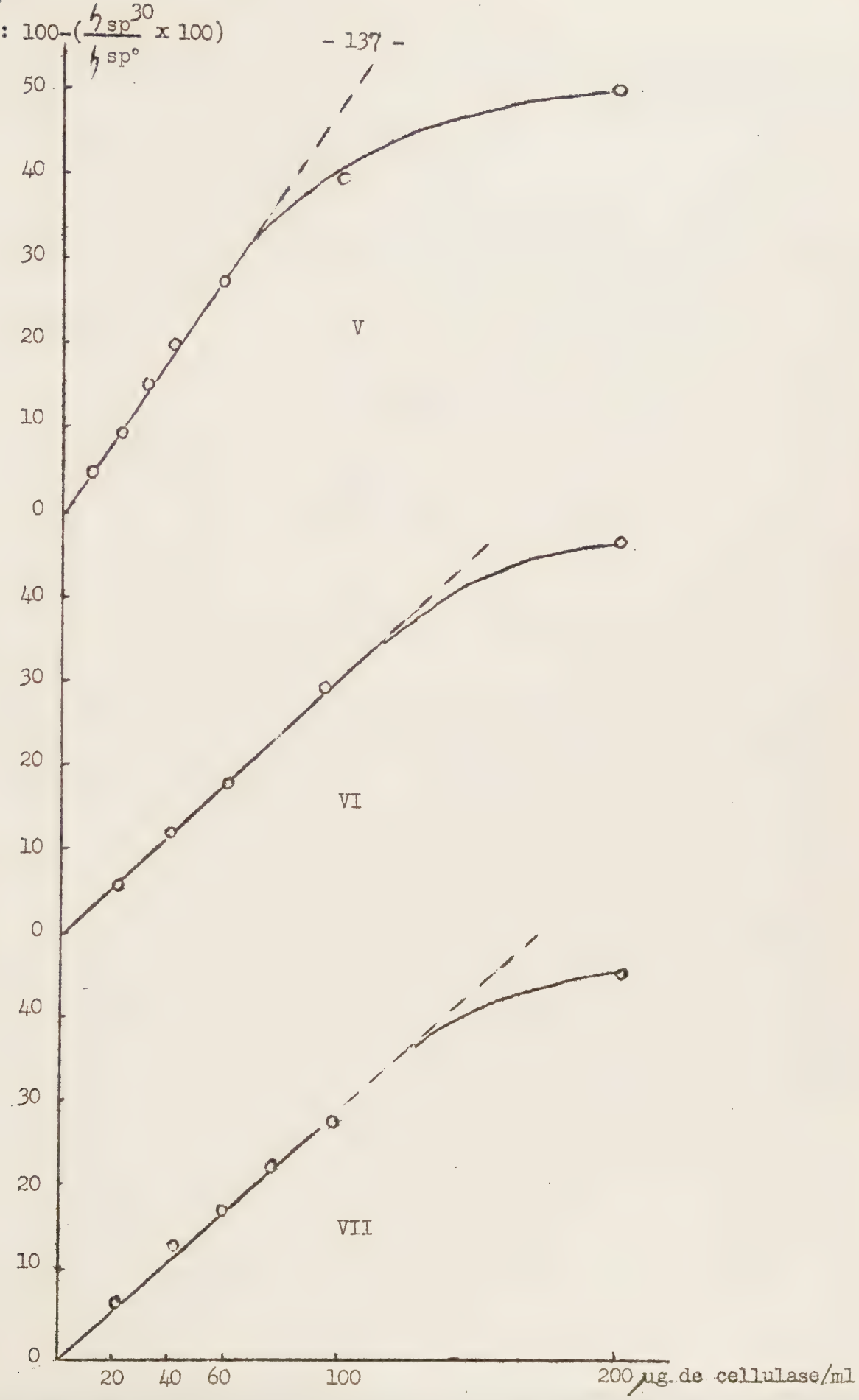


Figure 23 – Courbes de diminution de viscosité d'une solution d'HEC en présence de quantités croissantes des 3 cellulases.
ηsp^{30}: viscosité mesurée après 30 minutes d'incubation
ηsp° : viscosité du substrat au temps 0
en abscisses : µg d'enzyme/ml
en ordonnées : Dim-visc = $100-(\frac{\eta sp^{30}}{\eta sp^{\circ}} \times 100)$

où Dim-visc est le pourcentage de diminution de viscosité calculé comme nous l'avons indiqué page 133 et p le poids de préparation enzymatique en gramme dans un ml du mélange réactionnel.

Lorsque la Dim-visc ne dépasse pas 25, nous obtenons les valeurs suivantes pour les 3 préparations qui ont permis de dresser les courbes de la figure 23.

Préparation V :

$$U/g = \frac{25}{30 \times 50 \times 10^{-6}} = 16.667 \text{ U}$$

Préparation VI :

$$U/g = \frac{17,50}{30 \times 60 \times 10^{-6}} = 9.722 \text{ U}$$

Préparation VII :

$$U/g = \frac{18}{30 \times 60 \times 10^{-6}} = 10.000 \text{ U}$$

La relation entre Dim-visc et la quantité d'enzyme peut varier selon les préparations. Aussi des essais préliminaires fixant les concentrations d'enzyme qui provoquent une Dim-visc inférieure à 30 p. 100 de la viscosité initiale en 30 minutes sont nécessaires avant le dosage définitif.

La détermination de la viscosité devra en outre être effectuée rapidement, car l'enzyme poursuit son action pendant la mesure. C'est pour limiter ces causes d'erreur que nous avons choisi 30 minutes comme durée d'hydrolyse, le viscosimètre que nous utilisons permet en effet de réaliser la mesure en 30 secondes.

C) ACTION DES CELLULASES PHARM. SUR LA CELLULOSE INSOLUBLE

-o-o-o-

Des essais ont été faits, utilisant la cellulose de coton de DP 2.500, que nous a obligeamment offert Monsieur MEYBECK, Directeur de l'Institut Textile de Mulhouse.

1 ml du milieu réactionnel contient :

10 mg de cellulase

15 mg de coton

0,1 ml de tampon de pH 4

L'incubation est faite à 37°, sous agitation.

Les sucres réducteurs totaux sont dosés après 2, et 4 jours d'hydrolyse.

Aucune des 7 préparations utilisées n'a libéré de sucres réducteu à partir de la cellulose insoluble.

-o-o-o-

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS

-o-o-o-

Les essais de dosage des cellulases Pharm., utilisant comme substrat la cellulose de coton de DP déterminé, ont donné un résultat négatif: aucune des 7 préparations cellulasiques n'a attaqué ce substrat insoluble.

Nous avons par conséquent étudié les substrats solubles qui sont hydrolysés par la plupart des enzymes cellulolytiques et avons choisi les deux dérivés les plus utilisés à l'heure actuelle : la CMC et l'HEC.

Les dérivés cellulosiques du commerce ne présentent pas un degré de pureté suffisant pour être utilisés comme substrats dans des dosages enzymatiques. En effet, la présence de xylanes a été signalée dans les cellophanes du commerce. Or on sait que les préparations cellulasiques d'origine fongique contiennent, associées aux cellulases, un grand nombre d'osidases et de polysaccharidases, parmi lesquelles, des pentosanases.

L'emploi des dérivés cellulosiques solubles comme substrat est conditionné par le DS, dont la valeur doit rester fixe. Nous avons en effet constaté que la vitesse d'hydrolyse des cellulases diffère largement selon la valeur du DS du substrat. Il est donc nécessaire, si l'on veut disposer d'un substrat défini et constant, de le préparer à partir de la cellulose pure. Les caractéristiques du produit peuvent aisément être contrôlées par les techniques physiques et chimiques.

Dosage des cellulases :

L'hydrolyse des cellulases peut être suivie soit par la détermination de la baisse de viscosité du substrat, soit par le dosage des sucres réducteurs libérés.

Cette dernière mesure se heurte ici à des difficultés : avec des préparations partiellement purifiées, les sucres réducteurs donnent, en plus de l'activité cellulasique, l'ensemble des activités osidasiques.

D'autre part, la présence d'impuretés de nature saccharidique et protéique perturbe la détermination de la vitesse d'hydrolyse : l'activité des préparations déterminée par cette méthode ne se trouve proportionnelle, ni à la durée d'hydrolyse, ni à la concentration de l'enzyme.

Nous ne pouvons donc par le dosage des sucres réducteurs libérés, déterminer de façon satisfaisante l'activité cellulasique. Ce dosage permet tout au plus de fixer un essai limite d'activité minimum. Il en est de même de celui du glucose dans l'hydrolysat enzymatique. Un témoin enzyme doit nécessairement accompagner chaque dosage, afin d'éliminer les quantités importantes de sucres réducteurs apportés par l'enzyme. De plus, la durée d'incubation doit être assez courte : les cellulases Pharm. en solution sont rapidement inactivées sans doute par l'action des protéases qu'elles contiennent.

La mesure de la viscosité permet de déterminer l'action dépolymérisante des préparations cellulasiques. Dans le cas de l'HEC, au-dessous de 0-30 p. 100 de diminution de viscosité, pour une concentration donnée de substrat, la baisse de viscosité est proportionnelle à la concentration de l'enzyme. Il est donc nécessaire de se mettre dans cette zone favorable en faisant varier les concentrations d'enzyme. Les quantités de préparation enzymatique utilisées pour le dosage sont faibles; elles

réduisent de ce fait l'interférence due aux impuretés telles que saccharides réducteurs qui accompagnent l'enzyme. Cette méthode sensible permet en outre de doser, soit de faibles quantités d'enzymes, soit des enzymes faiblement actifs.

Des 2 dérivés étudiés, l'HEC se prête beaucoup mieux que la CMC à cette détermination. Sa viscosité n'est pas influencée par la présence de sels comme celle de la CMC.

Le mode d'expression des résultats à l'heure actuelle est arbitraire. En effet, la baisse de viscosité mesurée n'est pas reliée à la baisse du DP de la cellulose, ni à la production de sucres réducteurs. Pour relier les modifications physiques aux modifications chimiques, il faut un facteur de conversion. Ce facteur de conversion n'est pas établi à l'heure actuelle. Pour le déterminer, il nous faut connaître le nombre de liaisons osidiques susceptibles d'être coupées par l'enzyme dans la molécule d'HEC. Ceci nécessite de travailler avec un enzyme assez actif et pur[illegible].

-o-o-o-

-o-o-o-o-

Nous avons décrit une méthode de préparation de la CMC à partir du coton et celle de l'HEC à partir de la cellulose en poudre. Ces deux méthodes sont réalisables au laboratoire et ont permis d'obtenir des produits ayant une composition constante.

L'analyse de ces deux dérivés peut se faire par voie physique : détermination de la viscosité de leurs solutions aqueuses; et par voie chimique :

- l'acidimétrie, le dosage colorimétrique de l'acide glycolique combiné à la CMC, les cendres sulfuriques , l'oxydation nitrochromique et l'oxydation periodique permettent de doser la CMC.
- le dosage, après hydrolyse acide, des sucres réducteurs totaux libérés par la méthode à l'hypoïodite, du glucose par la glucose-oxydase, ainsi que l'oxydation nitrochromique et l'oxydation periodique permettent de doser l'HEC.

Le contrôle des deux substrats peut donc se faire par ces méthodes.

La détermination de l'activité cellulasique a été faite par la méthode physique : viscosimétrie et la méthode chimique : dosage des sucres réducteurs libérés par l'enzyme.

L'influence du degré de substitution du substrat (DS) sur la vitesse d'hydrolyse a été mise en évidence par l'emploi comme substrat de deux carboxyméthylcelluloses (CMC) de DS différents. La vitesse d'hydrolyse décroît lorsque la substitution de la molécule augmente.

L'importance de la durée d'hydrolyse a été démontrée. Une courte durée d'hydrolyse est préférable à une longue durée, afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme.

Lorsque l'on dose les substances réductrices libérées par la cellulase, il est nécessaire de constituer un témoin enzyme sans substrat. Cette mesure est motivée par l'importance des quantités de saccharides réducteurs qui accompagnent les cellulases employées en pharmacie et la libération de sucres réducteurs au cours de l'incubation des préparations enzymatiques impures en l'absence du substrat cellulosique.

La mesure de l'activité enzymatique utilisant la CMC comme substrat se fait difficilement par la méthode viscosimétrique : la viscosité des solutions aqueuses de CMC baisse en présence de sels minéraux.

En revanche, l'hydroxyéthylcellulose (HEC), se prête bien à cette détermination. Dans nos conditions opératoires, la baisse de viscosité de l'HEC est proportionnelle à la dose d'enzyme et permet une évaluation précise de l'activité cellulasique.

Nous avons décrit un protocole opératoire permettant de doser les cellulases pharmaceutiques d'après la diminution de viscosité de l'HEC.

-o-o-o-

B I B L I O G R A P H I E

-o-o-o-

1. AGARWAL (P.N.), BHANDARI (N.D.), RAMAN (R.S.) et PADMANABHAN (T.S.A.)
Indian J. technol., 1963, 1 (6), p. 227

2. AITKEN (R.A.), EDDY (B.P.), INGRAM (M.) et WEURMAN (C.)
Biochem. J., 1956, 64, p. 63

3. ANAGNOSTOPOULOS (C.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, p. 1115

4. ANAGNOSTOPOULOS (C.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)
Arch. Sci. Biol., 1955, 39, p. 631

5. BAMANN (E.) et MYRBACK (K.)
Methoden der Fermentforschung, 1941, 2, p. 1842

6. BARKER (S.A.), BOURNE (E.J.), STACEY (M.) et WHIFFEN (D.M.)
J. Chem. Soc., 1954, p. 171

7. BERNFELD (P.), BERKELEY (B.J.) et BIEBER (R.E.)
Archiv. Biochem. Biophys., 1965, 111, p. 31

8. BLUM (R.) et STAHL (W.H.)
Text. Rés. J., 1952, 22, p. 178

9. BROWN (C.J.) et HOUGHTON (A.A.)
J. Soc. Chem. Ind., 1941, 60, p. 254

10. CHARARAS (C.), COURTOIS (J.E.) et LAURANT-HUBE (H.)
Ann. Pharm. Fr. 1967, à l'impression

11. CHARPENTIER (M.)
Th. Doct. Etat Pharm. Paris 1965

12. [illegible] (S.S.) et [illegible] (M.S.)

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, p. 3954

13. COCHIN (J.)

Biochem. J., 1954, 58, [illegible]

14. CORBETT (W.M.)

in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER (R.L.) [illegible], Academic Press, 1963, 3, p. 3

15. CORDEBARD (M.)

J. Pharm. Chim., 1939, 30, p. 268

16. CORDEBARD (M.)

Th. Doct., Inst. Pharm. Nancy, 1941

17. COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.), et DEBRIS (M.M.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, p. 1173

18. COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)

Ann. Pharm. Fr., 1964, 22, p. 629

19. COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.), DEBRIS (M.M.) et LAURANT-HUBE (H.)

Ann. Pharm. Fr., 1964, 22, p. 545

20. COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.), DEBRIS (M.M.) et LAURANT-HUBE (H.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, p. 2219

21. COURTOIS (J.E.) et LINO (A.)

Les phosphatases des végétaux supérieurs; répartition et action in [illegible]OCHMEISTER (L.); Progrès dans la chimie des substances organiques, 1961, 19, p. 316-373

22. COWLING (E.B.)

in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials", REESE (E.T.) édit., Pergamon Press [illegible], p. 1-31

23. CROON (I.) et LINDBERG (B.)

Svensk Papperstid., 1956, 59, p. 794

24. DALOUL (M.), PETEK (F.) et COURTOIS (J.E.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, p. 1247

25. DER FONG FAN et MACLACHLAN (G.A.)

Can. J. Botany, 1966, 44 (8), p. 1025

26. DESARZENIEN (H.) et BASTIEN (C.)

Pharm. Acta Helv., 1958, 33, p. 583

27. DICKINSON (D.B.) et MAC COLLUM (J.P.)

Nature G.B., 1964, 203, n° 4944, p. 525

28. ENEBO (L.), SANDEGREN (E.) et LJUNGDAHL (L.)

J. Inst. Brewing, 1953, 59, p. 205

29. EYLER (R.W.), KLUG (E.D.), et DIEPHUS (F.)

Anal. Chem., 1947, 19, N° 1, p. 24

30. [illegible] (G.)

Symbolae Botanicae Upsalienses, 1947, IX, p. 2

31. FELSTENSTEIN (G.N.)

Biochem. J., 1959, 72, p. 75

32. FLEURY (P.), COURTOIS (J.E.) et COUSIN (D.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, p. 381

33. FLEURY (P.), COURTOIS (J.E.) et PERLES (R.)

Mikrochem. et Mikrochim. Acta, 1951, 36, et 37, p. 863

34. FLEURY (P.), COURTOIS (J.E.), PERLES (R.) et LE DIZET (P.)

Bull. Soc. Chim. France, 1954, p. 347

35. FLEURY (P.), PERLES (R.) et LE DIZET (P.)

Ann. Pharm. Fr., 1953, 11, p. 581

36. FLEURY (P.) et LANGE (J.)

J. Pharm. et Chim., 1933, 17, p. 107

37. GASCOIGNE (J.A.) et GASCOIGNE (M.M.)

Biological degradation of cellulose, Butterworths et Cie London, 1960

38. GILLIGAN (W.) et REESE (E.T.)

Can. J. Microbiol., 1954, 1, p. 90

39. GRASSMANN (W.) et RUBENHAUER (H.)

Münchener mediz. Wschr., 1931, p. 1817

40. GREEN (J.W.)

in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER (R.L.) édit., Academic Press, 1963, 3, p. 322

41. GUERNET (M.)

Th. Doct. Etat Sciences, Paris, 1963

42. HALL (C.B.) et MULLINS (J.T.)

Nature, 1965, 206 (4984) p. 638

43. HALLIWELL (G.)

in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials", REESE (E.T.) édit., Pergamon Press, 1963 p. 71-92

44. HALLIWELL (G.)

Biochem. J., 1958, 68, p. 605

45. HALLIWELL (G.)

Biochem. J., 1961, 79, p. 185

46. HALLIWELL (G.)

J. Gen. Microbiol., 1957, 17, p. 166

47. HAMMERSTROM (R.A.), CLAUS (K.D.), COGHLAN (J.W.) et MAC BEE (R.H.)
Arch. Biochem. Biophys., 1955, 56, p. 123

48. HASH (J.H.) et KING (K.W.)
J. Biol. Chem., 1958, 232, p. 381

49. HASHIMOTO (Y.) et NISIZAWA (K.)
in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials" REESE (E.T.) édit., Pergamon Press, 1963 p. 91

50. HOFFMAN (W.S.)
J. Biol. Chem., 1937, 120, p. 51

51. HOPPE-SEYLER
Ber. dtsch. Chem. Ges., 1883, 16, p. 122

52. HULTIN (E.)
Svensk. kem. Tidskr., 1948, 60, p. 131

53. HUTCHENS (J.O.) et KASS (B.M.)
J. Biol. Chem., 1949, 177, p. 571

54. IRVINE (J.C.)
J. Chem. Soc., 1923, 123, p. 898

55. IWASAKI (T.), TOKUYASU (K.) et FUNATSU (M.)
J. Biochem. Japan, 1964, 55, p. 30

56. JANSEN (E.F.) et MAC DONNELL (L.R.)
Arch. Biochem. Biophys., 1945, 8, p. 97

57. JERMYN (M.A.)
Austral. J. Sci. Res., 1952, 5, p. 433

58. JERMYN (M.A.)
Austral. J. Biol. Sciences, 1962, 15, p. 769

59. JERMYN (M.A.)

Austral. J. Sci. Res., 1952, 5, 409

60. JONES (D.M.)

Adv. Carbohydr. Chem., 1964, 19, p. 219

61. JORGENSEN (L.)

Studies on the partial hydrolysis of cellulose, Hos Emil Moesture, Oslo, 1950

62. JULLANDER (I.) et LAGERSTRÖM (O.)

in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER (R.L.) édit., Academic Press, 1963, 3, p. 303

63. KALMES (O.)

Th. Doctorat, Inst. Paper Chem., Appleton, Wis., 1959

64. KEILIN (D.) et HARTREE (E.F.)

Biochem. J., 1948, 42, p. 221

65. KEILIN (D.) et HARTREE (E.F.)

Biochem. J., 1952, 50, p. 331

66. KLOP (W.) et KOOIMAN (P.)

Biochem. Biophys. Acta, 1965, 99, p. 102

67. KLUG (E.D.)

in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER (R.L.) édit., Academic Press, 1963, 3, p. 315

68. KOOIMAN (P.)

J. cell. compar. Physiol., 1964, 63, p. 197

69. LANGE (P.W.)

Svensk. papperstidn., 1954, 57, p. 525

70. LASKER (R.) et GIESE (A.C.)

J. exper. Biol., 1956, 33, p. 542

71. LEVINSON (H.S.) et REESE (E.T.)

J. Gen. Physiol., 1950, 33, p. 601

72. LI (L.H.), FLORA (R.M.) et KING (K.W.)

Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111, p. 439

73. LYR (H.)

Archiv. Mikrobiol., 1959, 33, p. 266

34, p. 189

74. MANDELS (M.), MILLER (G.L.) et SLATER (R.W. Jr)

Arch. Biochem. Biophys., 1961, 93, p. 115

75. MARCHESSAULT (R.H.) et RANBY (B.G.)

Svensk papperstidn., 1959, 62, p. 230

76. MARSH (P.B.), BOLLENBACHER (K.), BUTLER (M.L.) et GUTHRIE (L.R.)

Text. Res. J., 1953, 23, p. 878

77. MARSH (P.B.), MEROLA (G.V.) et SIMPSON (M.E.)

Text. Res. J., 1953, 23, p. 831

78. MEIER (H.)

Svensk. Papperstidn, 1958, 61, p. 633

79. MILLER (G.L.) et BLUM (R.)

J. Biol. Chem., 1956, 218, p. 131

80. MULLER (D.)

Biochem. Z., 1928, 199, p. 136

81. MYERS (F.L.) et NORTHCOTE (D.H.)

Biochem. J., 1959, 71, p. 749

82. NELSON (N.)

J. Biol. Chem., 1944, 153, p. 375

83. NEVELL (T.P.)

in " Methods in Carbohydrate Chemistry "WHISTLER (R.L)

édit. Academic Press, 1963, 3, p. 180

84. NISIZAWA (K.) et HASHIMOTO (Y.)

Arch. Biochem. Biophys. 1959, 81, p. 211

85. NORKRANS (B.)

Symbolae Botanicae Upsalienses XI, 1950, p. 7-127

86. NORKRANS (B.)

Physiol. Plantarum, 1950, 3, p. 75

87. NORKRANS (B.)

Annual review of Phytopathology, 1963, 1, p. 325

88. NORDMANN (R.), GAUCHERY (O.), du RUISSEAU (J.P.), THOMAS (Y.) et NORDMANN (J.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, N° 10, p. 1461

89. NORTHROP (J.H.) et HUSSEY (R.G.)

J. Gen. Physiol., 1923, 5, p. 353

90. OKADA (G.), NISIZAWA (T.) et NISIZAWA (K.)

Biochem. J., 1966, 99, p. 214

91. PARTRIDGE (S.M.)

Nature, 1949, 164, p. 443

92. PAYEN (A.)

C.R.Acad.Sci, 1838, 7, p. 1052

93. PERLES (R.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, p. 307

94. PETTERSON (G.), COWLING (E.B.) et PORATH (J.)

Biochem. Biophys. Acta, 1963, 67, p. 1

95. PETTERSON (G.) et PORATH (J.)

Biochem. Biophys. Acta, 1963, 67, p. 9

96. PEW (J.C.)

Tappi, 1957, 40, p. 553

97. PEW (J.C.)

in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials", REESE (E.T.) édit., Pergamon Press 1963, p. 29

98. POCHON (J.)

Ann. Inst. Pasteur, 1935, 55, p. 676

99. PREECE (I.A.) et GARG (N.K.)

J. Inst. Brewing, 1961, 67, p. 267

100. PRESTON (R.D.)

Endeavour, London, 1964, 23, p. 153

101. PRINGSHEIM (H.) et BAUR (K.)

Z. Physiol. Chem., 1928, 173, p. 188

102. RANBY (B.G.) et MARCHESSAULT (J.)

Polymer. Sci., 1959, 36, p. 561

103. REESE (E.T.) et MANDELS (M.)

in "Methods in Carbohydrate Chemistry" WHISTLER (R.L.) édit., Academic Press, 1963, 3, p. 142

104. REESE (E.T.) et MANDELS (M.)

in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials", REESE (E.T.) édit., Pergamon Press 1962

105. REESE (E.T.) SIU (R.G.H.) et LEVINSON (H.S.)

J. Bacteriol., 1950, 59, p. 485

106. REESE (E.T.) et GILLIGAN (W.)

Arch. Biochem. Biophys., 1953, 45, p. 74

107. Report of the Commission on enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, 1961

108. RINAUDO (M.)

Th. Doctorat 3° cycle, Grenoble, 1965

109. ROLLINS (M.L.)

Anal. Chem., 1954, 26, p. 718

110. ROLLINS (M.L.) et TRIPP (V.W.)

Text. Res. J. 1954, 24, p. 345

111. ROUDIER (A.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, p. 1493

112. SEAMAN (J.F.), MOORE (W.E.) et MILLET (M.A.)

in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER (R.L.) édit., Perganon Press, 1963, 3, p. 54

113. SAKURADA (I.)

J. Soc. Chem. Ind. Japan, 1938, 31, p. 19

114. SEILLIERE (G.)

C.R. Soc. Biol., 1906, 61, p. 205

115. SELBY (K.) et MAITLAND (C.C.)

Biochem. J.,1965, 94, p. 578

116. SELBY (K.)

in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials", REESE (E.T.) édit., Pergamon Press 1963, p. 33

117. SHINICHIRO AKATSUKA, RUMIKO NIGATA et NOBUO TACY

Haldko Kogaku Zasshi, Japan 1964, 42, (6), p. 356

118. SILBERSCHMIDT (K.)

Münchener mediz. Wschr. 1931, p. 1819

119. SIMOLA (P.E.)

Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser A 34 N° 1, 1931, p. 1

120. SOMOGYI (M.)

J. Biol. Chem., 1945, 160, p. 69

121. SPIK (G.) et MONTREUIL (J.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, p. 739

122. SPURLIN (H.M.)

J. Am. Chem. Soc., 1939, 61, p. 2222

123. SULTZE (R.F.) Jr

Tappi, 1957, 40, p. 985

124. TIMELL (T.E.)

in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER (R.L.) édit., Pergamon Press, 1965, 5, p. 100

125. TOYAMA (M.)

J. Ferment. Techn. Japan, 1956, 34, p. 281

126. TOYAMA (M.)

in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials", REESE (E.T.) édit., Pergamon Press, 1963, p. 235

127. TRACEY (M.V.)

Biochem. J., 1950, 47, p. 431

128. TRACEY (M.V.)

in "Marine Boring and Fouling Organisms", RAY (D.L.) édit., University of Washington Press, Seattle, Washington 1959

129. TRIPP (V.W.) et ROLLINS (M.L.)

Anal. Chem., 1952, 24, p. 172

130. UEDA (K.), ISHIKAWA (S.), ITAI (T.) et ASAI (T.)

J. Agric. Chem. Soc. Japan, 1952, 26, p. 35

131. WALSETH (C.S.)

Tappi, 1952, 35, p. 233

132. WARDROP (A.B.)

Tappi, 1957, 40, p. 225

133. WHARTON (D.R.), WHARTON (M.L.) et LOLA (J.E.)

J. Insect. Physiol., 1965, 11, p. 94

134. WHITAKER (D.R.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, p. 1701

135. WHITAKER (D.R.), COLVIN (J.R.) et COOK (W.H.)

Arch. Biochem. Biophys., 1954, 49, p. 257

136. WHITAKER (D.R.)

Arch. Biochem. Biophys., 1953, 43, p. 253

137. WHITAKER (D.R.)

in "Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials", REESE (E.T.) édit., Pergamon Press 1963, p. 51

138. WHITAKER (D.R.)

Can. J. Biochem. Physiol., 1956, 34, p. 488

TABLE DES MATIERES

-o-o-o-

Pages

INTRODUCTION..... 1

GENERALITES..... 5

CELLULOSES ET HEMICELLULOSES..... 7

a) Structure chimique de la cellulose..... 7

b) Structure physique et constituants de la cellulose. 8

c) Structure des hémicelluloses..... 10

ENZYMES CELLULOLYTIQUES..... 11

A) Origine des cellulases..... 11

- Cellulases du règne végétal..... 11

- Cellulases du règne animal..... 12

- Cellulases bactériennes..... 13

- Cellulases fongiques..... 13

B) Modes d'action des cellulases..... 14

C) Choix du substrat..... 16

PREMIERE PARTIE : TECHNIQUES GENERALES UTILISEES..... 25

I) Oxydation periodique..... 25

II) Oxydation nitrochromique..... 26

III) Dosage des sucres réducteurs libérés par les cellulases..... 28

a) Méthode utilisant le réactif de Somogyi-Nelson..... 29

b) Méthode utilisant le ferricyanure de potassium..... 29

IV) Dosage du glucose par la glucose-oxydase..... 29

V) Mesure de la viscosité..... 31

a) Définition de la viscosité..... 31

b) Appareils de mesure..... 32

c) Unités de viscosité..... 33

Technique opératoire avec le viscosimètre à rotation.. 33

DEUXIEME PARTIE :

CHAPITRE I : PREPARATION - ESSAIS ANALYTIQUES DE LA CMC..... 39

I) Préparation de la CMC..... 39

a) Purification de la matière première..... 40

b) Condensation avec l'acide monochloracétique..... 41

II) Essais analytiques de la CMC..... 42

A) Détermination du DS de la CMC..... 43

1) Détermination du DS par le dosage acidimétrique des carboxyles..... 44

2) Détermination du DS par colorimétrie..... 45

3) Détermination du DS par pesée des cendres sulfuriques..... 50

B) Détermination des groupements α-glycols libres par oxydation periodique..... 53

C) Oxydation nitrochromique..... 59

D) Hydrolyse acide de la CMC..... 65

E) Viscosité des solutions aqueuses de CMC..... 66

CHAPITRE II : PREPARATION - ESSAIS ANALYTIQUES DE L'HEC..... 67

I) Préparation de l'HEC..... 67

II) Essais analytiques de l'HEC..... 72

A) Hydrolyse acide de l'HEC..... 72

a) Dosage des saccharides réducteurs par l'iode en milieu alcalin..... 73

b) Dosage du glucose par la glucose-oxydase..... 74

c) Chromatographie des sucres libérés par l'hydrolyse acide..... 75

B) Oxydation periodique..... 76

C) Oxydation nitrochromique..... 76

D) Viscosité des solutions aqueuses [illegible]..... 83

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS DES ESSAIS DE PREPARATION ET DE CONTROLE DES SUBSTRATS..... 85

TROISIEME PARTIE

A) Hydrolyse enzymatique de la CMC..... 89

1°- Activité en fonction du pH..... 89

2°- Activité en fonction des concentrations du substrat 92

3°- Activité en fonction du DS du substrat..... 99

4°- Activité en fonction de la durée d'hydrolyse..... 100

5°- Détermination de l'activité cellobiasique des cellulases-Pharm..... 111

6°- Etude sommaire des produits de l'hydrolyse enzymatique..... 113

7°- Détermination de l'activité cellulasique par viscosimétrie..... 114

- Viscosité de la CMC en présence de sels..... 115

- Viscosité des hydrolysats enzymatiques..... 116

B) Hydrolyse enzymatique de l'HEC..... 121

1) Activité en fonction du pH..... 121

2) Activité en fonction des concentrations d'enzyme . 122

a) Hydrolyse de l'HEC par de fortes concentrations d'enzyme..... 122

b) Activité en fonction de faibles concentrations d'enzyme..... 127

3) Détermination de l'activité cellulasique par viscosimétrie..... 128

a) Diminution de viscosité en fonction de la durée d'hydrolyse..... 128

b) Diminution de la viscosité en fonction des quantités d'enzyme 133

c) Action des cellulases sur les solutions d'HEC conservées à la glacière..... 135

d) Mode d'expression des résultats..... 136

C) Action des cellulases-Pharm. sur la cellulose insoluble..... 140

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS..... 141

RESUME..... 145

BIBLIOGRAPHIE..... 147

TABLE DES MATIERES..... 159

-o-o-o-

Vu, le Président de Thèse,

Pr. COURTOIS

Vu, le Doyen de la Faculté,

Pr. MALANGEAU

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE